

DISEÑO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN EMBUTIDOS UTILIZANDO EXTRACTO DE FLOR DE JAMAICA.

Araceli Castañeda Ovando^{(1)*}, Carlos A. Galán-Vidal⁽²⁾, José A. Rodríguez⁽²⁾, Elizabeth Contreras-López⁽¹⁾, Juan Ramírez Godínez⁽¹⁾

1) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Laboratorio de Físicoquímica de Alimentos 2. Carr. Pachuca-Tulancingo, Km. 4.2, Mineral de la Reforma, Hidalgo. C.P. 42184. Tel: +52 (771) 7172000 Ext. 2512. e-mail: ovandoa@uaeh.edu.mx.

2) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Laboratorio de Electroquímica. Carr. Pachuca-Tulancingo, Km. 4.2, Mineral de la Reforma, Hidalgo. C.P. 42184. Tel: +52 (771) 7172000 Ext. 2202.

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*), de la familia de las malváceas, es originaria de África, fue introducida a México en la época colonial y desde entonces se ha cultivado en regiones cálidas y semicálidas de nuestro país, siendo los estados de Guerrero, Oaxaca, Colima, Nayarit y Campeche los principales productores. El cáliz o flor es la parte que más se aprovecha de la planta; en México se utiliza en bebidas refrescantes, gelatinas y tés, así como para la preparación de mermeladas, ates, jalea, cremas y otros derivados.

Los pigmentos abundantes en la flor de Jamaica son las antocianinas, que son responsables del color rojo y de su capacidad antioxidante [1,2]. Las principales antocianinas identificadas en estas flores son la cianidina-3-sambubiósido y la delfinidina-3-sambubiósido [3].

Las antocianinas presentan baja estabilidad durante el proceso y el almacenaje; la luz, el pH, la temperatura, el oxígeno, el ácido ascórbico y los azúcares se consideran como factores importantes que influyen en su degradación o estabilidad [4]. En lo que respecta a la degradación, diversas investigaciones han descrito reacciones entre las antocianinas y especies oxidantes, reductores, nucleófilos y electrófilos [5]; un ejemplo de éstas es la decoloración, que se presenta cuando se condensan ciertos aminoácidos, catequinas u otros nucleófilos con sales de flavilio, dando origen a productos incoloros, los cuales son reactivos y sufren cambios adicionales [6].

El ión nitrito es uno de los nucleófilos que provoca la decoloración de las antocianinas. Este ión es un analito de suma importancia en la industria alimentaria, pues es utilizado como conservador en los embutidos y es un elemento fundamental en la estabilidad del color en los productos en salmuera. El color de estos productos conservados bajo vacío no es estable más que en presencia de una cantidad mínima de nitrito residual. Por otro lado, el poder bacteriostático del nitrito fue demostrado en 1941, cuando se comprobó que aumentaba principalmente en medio ácido, y este poder se ha reconocido frente a un gran número de cepas principalmente de *Clostridia* y algunos *Staphylococos*. El poder inhibitor del nitrito depende de su concentración, del pH, de la presencia de nitratos, del número de bacterias, de la temperatura de almacenaje y del hecho de que el producto haya sufrido un tratamiento térmico o no. Hacia 1976 se llegó a la conclusión de que 100 mg kg⁻¹ de nitrito incorporados a los productos sometidos a un tratamiento térmico son suficientes para asegurar la protección antibotulínica, poco tiempo después (1979) se demostró que esta cantidad puede ser disminuida añadiendo ácido ascórbico.

Los métodos oficiales para la determinación del nitrito en productos cárnicos (NOM-122-SSA1-1994 [7] y AOAC 973.31 [8]) implican, en su mayoría, procedimientos espectrofotométricos basados en la reacción de Griess, en la cual el nitrito reacciona con la sulfanilamida en medio ácido. El diazo compuesto formado reacciona con el clorhidrato de N-naftiletildiamina (NED), generando un compuesto de coloración roja intensa [9]. Una de las desventajas que presenta la

reacción de Griess es que se lleva a cabo la formación de colorantes de tipo azoico, los cuales tienen un alto grado de toxicidad [10].

Debido a lo anteriormente expuesto y aprovechando las reacciones de degradación de las antocianinas, en el presente trabajo se realiza un diseño de experimentos de tipo factorial para la determinación de nitritos mediante la reacción de degradación de antocianinas con ión nitrito y se comparan los resultados obtenidos con el método estándar (Método de Griess).

EXPERIMENTACIÓN

Reactivos y soluciones

Todos los reactivos fueron utilizados tal como se recibieron. El HCl y el NaNO₂ fueron obtenidos de J.T. Baker. La muestra de flor de Jamaica fue obtenida en el supermercado. El agua desionizada (18.2 MΩ cm) utilizada para preparar las soluciones se tomó de un equipo Milli-Q de Millipore. Se preparó una solución patrón de ión nitrito 100 mg L⁻¹, pesando la cantidad adecuada de NaNO₂ y disolviendo en agua desionizada, a partir de la cual se prepararon las soluciones estándar utilizadas en los diferentes experimentos. NED: se disolvieron 0.2 g de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina en 150 mL 15%(v/v) de ácido acético. Sulfanilamida: se disolvieron 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15% (v/v).

Equipo

La temperatura fue controlada con un baño recirculador de LAUDA Brinkmann. Todas las medidas se realizaron utilizando un espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo Lambda 40 con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, a una longitud de onda de 515 nm para el método propuesto y de 540 nm para el método estándar.

Obtención de la muestra

Para preparar el extracto se pesaron 50 g de flor de Jamaica, previamente secada a temperatura ambiente durante una semana, y se agregaron aproximadamente 700 mL de agua desionizada, se mantuvo en reposo durante una noche y se filtró; el filtrado se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L y se agregó agua hasta completar el volumen. El contenido total de antocianinas en el extracto se realizó utilizando el método de pH diferencial [11], para lo cual se prepararon 2 soluciones del extracto, una a pH 1 y la otra a pH 4.5, y se obtuvieron los espectros UV-Vis correspondientes en una ventana espectral de 250 a 750 nm. Este experimento se realizó durante varios días con el fin de determinar si había cambios significativos del contenido de antocianinas en los extractos que pudieran modificar la reproducibilidad del método.

Curvas de calibración

A partir de la solución de nitritos de 100 mg L⁻¹ se prepararon otras de 0 (blanco) a 5 mg L⁻¹, agregando HCl 1 mol L⁻¹ (pH final de 1), un volumen conocido de extracto (obteniendo una medida de absorbancia en un blanco entre 0.7 y 0.8 u.a.) y completando el volumen a 25 mL.

Diseño experimental

Para obtener los principales factores en la determinación de nitritos por degradación de las antocianinas se llevó a cabo un diseño experimental (2³), en el cual los factores de control fueron el ultrasonido (US), el tiempo (t) y la temperatura (T); los tres factores de control se trabajaron a dos niveles [-, +] (Tabla 1).

De acuerdo a los factores de control, se obtiene un número de 2³ (8) experimentos, los cuales se llevaron a cabo por duplicado; la respuesta a optimizar fue la pendiente (sensibilidad del método). Para realizar los experimentos, las combinaciones se aleatorizaron. En la Tabla 2 se presentan las combinaciones y el orden en que se realizaron los experimentos.

Tabla 1. Condiciones utilizadas en el diseño factorial.

Factor controlado	Código de Factor	Nivel	
		Bajo (-)	Alto (+)
t (min)	A	5	10
T (°C)	B	Ambiente	60
US	C	Sin	con

Tabla 2. Combinaciones de los factores y orden en que se llevaron a cabo los experimentos.

Combinación	Factor			Orden	Combinación	Factor			Orden
	A	B	C			A	B	C	
1	-	-	-	7	bc	-	+	+	1
a	+	-	-	8	ac	+	-	+	6
b	-	+	-	3	ab	+	+	-	2
c	-	-	+	4	abc	+	+	+	5

Análisis de muestras reales

Los resultados cuantitativos para muestras de embutidos fueron obtenidos con el método oficial basado en la reacción de Griess (método estándar) y el método basado en la reacción de decoloración entre el extracto crudo de flor de Jamaica y el ión NO_2^- (método propuesto).

Tratamiento de la muestra

Se tomaron como muestras reales embutidos comerciales de los cuales se realizaron 3 réplicas de cada uno. Para el tratamiento de la muestra se picaron finamente cerca de 30 g de muestra pesados con exactitud (%DER=0.66, n=6), y se transfirieron a vasos de precipitados de 250 mL. Después se agregó 50 mL de agua calentada a 80°C y se mantuvo la mezcla en calentamiento durante 15 minutos y después fue transferida a un matraz volumétrico de 200 mL. Se adicionó suficiente agua caliente hasta llegar a un volumen cercano a 150 mL. El matraz se mantuvo en baño de vapor durante 2 h, agitándose ocasionalmente. La solución se enfrió a temperatura ambiente, y se le añadieron 10 mL de suspensión de $\text{Al}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$, después fue centrifugada para aclararla (17500 rpm, por 25 minutos); y ya clarificada se transfirió a un matraz volumétrico de 200 mL y finalmente el volumen fue completado con agua desionizada. De cada una de las réplicas se tomaron 2 alícuotas, una para desarrollar el método propuesto y otra para el método estándar (Método de Griess).

Determinación de nitritos (Método de Griess)

De la solución patrón de nitritos de 100 mg L⁻¹ se prepararon estándares de 0 a 1 mg L⁻¹, llevando el volumen necesario a un matraz volumétrico de 25 mL; a cada uno de ellos se le agregó 1.25 mL de reactivo de NED y después de 5 min se le añadió 1.25 mL de solución de sulfanilamida, aforando con agua desionizada hasta completar el volumen. Transcurridos 5 min se tomó la lectura de absorbancia de cada uno de ellos a una longitud de onda de 540 nm. Para la determinación de nitritos en las muestras reales, se tomaron 10 mL de cada una de las soluciones finales transfiriéndolos a matraces volumétricos de 25 mL y dándoles el mismo tratamiento que a los estándares.

Determinación de nitritos (Método propuesto)

De acuerdo a los resultados obtenidos del diseño de experimentos, se prepararon soluciones en el intervalo de 0-4 mg L⁻¹ a partir de la solución de nitritos de 100 mg L⁻¹, agregando 2.5 mL de HCl 1 mol L⁻¹ (para obtener un pH de 1), y la cantidad de extracto requerida para que en la solución blanco diera una lectura de absorbancia entre 0.7 y 0.8 u.a.; completando el volumen con agua desionizada a 25 mL. Los matraces se colocaron en un baño termostático a 60°C

durante 5 minutos. Después de este tiempo se tomaron las lecturas de absorbancia de cada uno de ellos a una longitud de onda de 515 nm. Para las muestras reales se tomaron 25 mL de cada una de las soluciones finales y se transfirieron a matraces volumétricos de 50 mL, agregando 5 mL de HCl 1 mol L⁻¹ y el volumen requerido de extracto (de acuerdo al factor de dilución), agregando agua desionizada para completar el volumen. Después de esto se le realizó el mismo procedimiento que a los estándares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método propuesto para la determinación de nitritos en embutidos

El contenido total de antocianinas en el extracto, calculado mediante el método de pH diferencial, y utilizando datos espectroscópicos de la Cianidina-3-glucósido [11] fue de 463.40 mg L⁻¹. De acuerdo con estos resultados, considerando que la reacción entre la antocianina y el ion nitrito es equimolar, tomando como antecedentes las reacciones que se llevan a cabo con otros nucleófilos, y que las antocianinas mayoritarias en el extracto de flor de Jamaica son la Cianidina-3-sambubiósido y la Delfinidina-3-sambubiósido, se propone el esquema de reacción mostrado en la Figura 1.

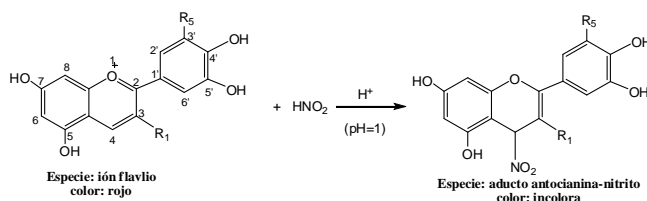


Figura 1. Esquema propuesto para la reacción entre las antocianinas presentes en el extracto de flor de Jamaica y el ión nitrito. Donde: R₅= H (para Cianidina) y OH (para Delfinidina); R₁= sambubiósido.

Efecto de los factores en la respuesta

El pH se fijó en 1.0, debido a que bajo estas condiciones se tiene al ión flavilio como especie predominante, favoreciendo los ataques nucleofílicos [11]. Este ión presenta una banda de absorción en la región del UV-Vis ($\lambda_{\text{max}}=515$ nm) que va disminuyendo conforme el ión nitrito degrada a la antocianina, facilitando la determinación del ión nitrito. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de cada uno de los experimentos, en función a la respuesta que se pretende optimizar (pendiente).

Tabla 3. Pendientes medias obtenidas para cada uno de los experimentos realizados (n=2). La codificación utilizada en las combinaciones viene dada de la Tabla 2.

Combinación	Pendiente	%DER	Combinación	Pendiente	%DER
1	-0.1023	0.21	bc	-0.1179	0.14
a	-0.1090	0.06	ac	-0.1161	0.12
b	-0.1138	2.34	ab	-0.1159	0.12
c	-0.1019	2.64	abc	-0.1296	0.49

Asimismo, se calcularon los efectos de cada factor en la respuesta (efectos individuales) así como los efectos de las diferentes interacciones [12]. Para contrastar si cada uno de los efectos es significativo (**H**₀: el factor no afecta la respuesta), se compararon cada uno de los cuadrados

medios (CM) con el CM residual, F_{cal} ; el CM residual para esta serie se obtuvo del ANOVA de dos vías de las medidas individuales, teniendo un valor de 1.17×10^{-5} ($P=0.05$). Los resultados que se obtuvieron se presentan en la Tabla 4. De acuerdo al número de grados de libertad, se obtiene una $F_{crit}=8.073$ ($P=0.05$), lo cual indica que los efectos significativos sobre la pendiente son los de los factores t, T y t-T ($F_{cal} > F_{crit}$). De hecho, se puede observar que el US es el único factor que no tiene un efecto significativo sobre las respuestas; además de que la interacción entre los tres factores no es significativa. Dado que el US no es un factor que tenga un efecto significativo, los experimentos que se considerarían para seleccionar las mejores condiciones son: 1, a, b y ab, con pendientes de -0.1022, -0.1090, -0.1138 y -0.1159. Por otro lado, de acuerdo a resultados obtenidos previamente del estudio cinético de la reacción de degradación de antocianinas con ión nitrito, se encontró que a 5 minutos la reacción se completa, por lo que para los experimentos siguientes se selecciona el experimento b (t=5 min, T=60°C y sin US), teniendo como ventaja que el análisis se lleva a cabo en menos tiempo.

Tabla 4. Efecto de los factores en la respuesta y comparación con el cuadrado medio residual ($CM_{res}=1.17 \times 10^{-5}$).

Factores	Efecto	Cuadrado medio	F_{cal}
US	-6.58×10^{-3}	8.65×10^{-5}	7.41
t	-8.60×10^{-3}	1.48×10^{-4}	12.68
T	-1.13×10^{-2}	2.57×10^{-4}	21.98
US-t	-5.80×10^{-3}	6.73×10^{-5}	5.76
US-T	-6.58×10^{-3}	8.65×10^{-5}	7.41
t-T	-8.60×10^{-3}	1.48×10^{-4}	12.68
US-t-T	-1.65×10^{-3}	5.44×10^{-6}	0.47

Parámetros analíticos del método propuesto

Bajo las condiciones de t = 5 min, T = 60°C y sin US, se realizaron las curvas de calibración utilizando soluciones estándar en el intervalo de concentraciones entre 0 y 5 mg L⁻¹ de nitrito y realizando cinco réplicas de cada una de ellas, construyéndose la curva de calibración a partir de las absorbancias medias. Los parámetros de regresión de las curvas de calibración se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, absorbancia vs concentración de NO₂⁻ (mg L⁻¹).

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Desv. estándar residual, s_e	0.023	Pendiente, $b \pm ts_b$	-0.1118 ± 0.0074
Número de estándares, n	6	Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	0.57-4.0
Coefficiente de correlación, r^2	0.9960	Límite de detección (mg L ⁻¹)	0.48
Ordenada en el origen, $a \pm ts_a$	0.8878 ± 0.018	Reproducibilidad (%DER, n=5, 2 mg L ⁻¹)	2.16

Análisis de muestras reales

Se determinó la concentración de ión nitrito en todas las muestras utilizando ambos métodos (estándar y propuesto), el contenido medio de dicho analito, para ambos métodos se muestran en la Tabla 6. Con la finalidad de evaluar la existencia de diferencias significativas entre los dos métodos, se compararon los resultados obtenidos del método estándar con los del método propuesto. Para ello se llevó a cabo una prueba de significación t, suponiendo varianzas

diferentes [12], y con la hipótesis nula H_0 que no había diferencias significativas entre la media de los resultados obtenidos con el método estándar (\bar{x}_1) y la media de los resultados obtenidos con el método propuesto (\bar{x}_2). El valor de $t_{cal} = 0.04$ se comparó con el valor $t_{crit}(5) = 2.57$ para los grados de libertad correspondientes con un nivel de significación del 95 %. Ya que $t_{cal} < t_{crit}$, se acepta la hipótesis nula, es decir, que los datos obtenidos mediante ambos métodos no difieren significativamente.

Tabla 6. Contenido medio de NO_2^- (expresado como mg de NaNO_2 por kg de muestra).

Muestra	Método estándar (%DER, n=3)	Método propuesto (% (DER, n=3)
1	8.16 (2.36)	8.57 (2.82)
2	8.54 (2.26)	9.05 (2.67)
3	8.35 (2.31)	8.81 (2.75)
4	2.62 (0.64)	2.21 (2.58)
5	2.65 (0.64)	2.10 (2.72)
6	2.63 (0.64)	2.15 (2.65)

CONCLUSIONES

El análisis estadístico de los resultados obtenidos del diseño experimental que se realizó demuestra que los principales efectos de los factores los presenta el tiempo de reacción y la temperatura, siendo el segundo el que tiene el mayor efecto.

Haciendo un análisis estadístico entre las concentraciones de nitrito obtenidas por los dos métodos (estándar y propuesto) se demuestra que no difieren significativamente a un nivel de significación del 95%. De acuerdo con los resultados obtenidos se propone el uso de un método más barato y con generación de residuos que se pueden considerar no tóxicos, a diferencia de los que se obtienen en la reacción de Griess (generación de diazo compuestos).

REFERENCIAS

- [1] P.J. Tsai, J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden, B.R. Jordan. Food Research International. **35**, 351-356 (2002).
- [2] P.J. Tsai, H.P. Huang. Food Research International. **37**, 313-318 (2004).
- [3] M.M. Giusti, L.E. Rodríguez-Saona, D. Griffin, R. Wrolstad. Journal of Agriculture and Food Chemistry. **47**, 4657-4664 (1999).
- [4] R.L. Jackman, R.Y. Yada, M.A. Tung, R.A. Speers. Journal of Food Biochemistry. **11**, 201-247 (1987).
- [5] G.A. Iacobucci, J.G. Sweeny. Tetrahedron. **39(19)**, 3005-3038 (1983).
- [6] P. Markakis. Stability of anthocyanins in foods. In P. Markakis (Ed.), Anthocyanins as food colors Academic Press, USA (1982).
- [7] NOM-122-SSA1-1994 Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de Agosto de 1994.
- [8] AOAC Official Methods of Analysis (1990). 973.31 Nitrites in cured meat. Colorimetric method. Pp. 938.
- [9] B.F. Jay. Analytical Chemistry. **51(9)**, 1493-1502 (1979).
- [10] N. Mathur, P. Bhatnagar. Journal of Environmental Biology. **28(1)**, 123-126 (2007).
- [11] R.E. Wrolstad, R.W. Durst, J. Lee. Trends in Food Science & Technology. **16**, 423-428 (2005).
- [13] J.N. Miller, J.C. Miller. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ta. Edición. Prentice Hall, España (2002).