

Reacción de la mioglobina con el nitrito a diferentes pH y tiempos de reacción¹

Myoglobin and nitrite reaction at different pH and reaction time

Marco Tulio Rincón²
Enrique Márquez²
Dámaso Mujica²
Beatriz Arias de Muñoz³
Pedro Izquierdo²

Resumen

A fin de estudiar la eficiencia de la mioglobina de diferentes especies para reaccionar con el nitrito en sistemas cárnicos y su dependencia con el pH y tiempo de reacción, se procedió a obtener un extracto de proteínas solubles a partir de carnes frescas molidas de res y pollo. El extracto se dividió en dos porciones. Una porción se ajustó a una misma concentración de proteína y la otra a una misma concentración de pigmento. A ambos extractos se les adicionó nitrito de sodio y ácido eritórbito, y se incubaron a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4, 6 y 24 horas). A los extractos estandarizados a una misma concentración de pigmento se les adicionó buffer fosfato para ajustar el pH (4, 6 y 8). La eficiencia en la formación del pigmento nitroso-mioglobina (NOMB) se midió indirectamente a través de la determinación del nitrito residual (NR). A pH 6 se utilizó un control (agua+nitrito+ eritorbato) para comparar los niveles con y sin extracto. Los resultados obtenidos indican que la presencia de mioglobina es necesaria para disminuir los niveles de nitrito residual. Cuando se compararon a una misma concentración de proteínas los extractos con mioglobina de res mostraron mayor eficiencia en reducir los niveles de nitrito residual que los extractos con mioglobina de pollo, pero cuando se compararon a una misma concentración de pigmento, los extractos de carne de pollo fueron más eficientes. Se observó una interacción entre el pH y el tiempo de reacción, indicando que el efecto del pH depende del tiempo de reacción. El extracto de carne de pollo fue menos afectado por el pH que el extracto de carne de res.

Palabras claves: Nitrito residual, mioglobina, fibra roja, fibra blanca

Recibido el 25-10-93 • Aceptado el 11-03-94

1 Trabajo realizado con el apoyo económico del CONDES

2 Unidad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, FCV-LUZ

3 Dpto de Producción e Industria Animal.

Abstract

To study the effect of reaction time and pH on nitrite and myoglobin reaction, pigment extracts from beef and chicken meat were prepared. One portion of the extract was adjusted to contain the same protein percent and the other was adjusted to the same pigment content. Nitrite and erythorbate were added to the extracts and the reaction of myoglobin with nitric oxide was monitored at pHs 4, 6, and 8. At pH 6, residual nitrite was measured at different time of reaction (0, 2, 4, 6, and 24 hr), a control (water, nitrite, and erythorbate) was prepared. Results indicated that the presence of myoglobin is necessary to reduce the levels of nitrite in solution. At the same protein content beef extracts were more efficient in reducing the levels of residual nitrite; however, at the same pigment content chicken extracts were more efficient. An interaction between pH and reaction time was observed to both beef and chicken extracts indicating that pH effect depend on the reaction time. Chicken extracts were less affected by the pH than beef extracts.

Key Words : Residual nitrite, myoglobin, red fiber, white fiber

Introducción

Las sales del nitrito son utilizadas en la industria de las carnes curadas para proveer a los productos de una pigmentación y aroma característicos, además de poseer este compuesto propiedades antimicrobianas, especialmente contra el *Clostridium botulinum* (16,19,21).

El pigmento característico de las carnes curadas es originado, mediante mecanismos de óxido-reducción, por la adición de óxido nítrico (NO) a la molécula de mioglobina (Mb) para formar un complejo denominado **nitrosomioglobina** (NOMb) en carnes curadas frescas y **nitrosohemocromo** y globina desnaturalizada en carnes curadas cocidas (9,12,24).

Dentro de la cadena de reacciones que dan origen al pigmento del curado hay que comenzar con el hecho de que el nitrito en solución acuosa

sa puede ser convertido rápida y reversiblemente en ácido nitroso (HNO₂) dependiendo del estado de oxidación del sistema (10,21), esta reacción es afectada por el pH (11,26). Tras la formación de este ocurre una dismutación paulatina, en la que interviene un agente reductor, que da origen al NO (11) y en raras oportunidades al trióxido de nitrógeno (N₂O₃) (21). En esta última reacción se ha postulado la presencia de un intermediario tipo radical semiestable entre el HNO₂ y el agente reductor-v.g ácido ascórbico, revelando en algunas investigaciones (11,12,26) una dependencia del pH en la formación de este intermediario.

La concentración de Mb en el músculo varía de acuerdo a la especie, siendo menor en músculos de aves (preponderantemente fibras blancas) que en los músculos del va-

cuno (preponderantemente fibras rojas) y aún varía dentro de la misma especie en los distintos músculos del aparato locomotor de un mismo animal (3,4,6,12,15,20).

En experimentos realizados con carnes rojas y blancas de un mismo animal (cerdo), se encontró que las carnes rojas tienden a mantener mayores niveles de NR. Este resultado se justificó basado en mayor pH

que presentaron las carnes rojas (18). En otro experimento se demostró que el nitrito residual es mayor en las carnes rojas (cerdo) que en las carnes blancas (pollo) si estas no son de la misma especie (18).

El propósito de este trabajo fué estudiar el efecto que diferentes niveles de pH y tiempos de reacción tienen sobre la afinidad de la mioglobina por el nitrito.

Materiales y métodos.

Extracción de pigmentos y preparación de las mezclas

Para la preparación de los extractos se utilizó carne fresca molida de res (pulpa negra) y pollo (muslo) a la cual se le separó toda la grasa posible, se mezcló la carne con agua destilada fría (4°C) en proporción 1:4, luego de 15 minutos de agitación suave se filtró a través de papel de filtro Wathman No 1. Al filtrado se le practicó una determinación de proteínas totales y contenido de pigmento. Las proteínas se determinaron utilizando el método de Biuret, midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Karl Seiz PMQ-II). La concentración de proteína se determinó utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina. Una vez determinada la concentración de proteína, los extractos se dividieron en dos porciones. Una porción se ajustó con agua destilada a una misma concentración de proteínas, a la otra porción se le determinó el contenido de pigmento de acuerdo al procedimiento de Warris (27), para lo cual se procedió

de la siguiente manera: se tomaron 4 ml del extracto en un tubo de ensayo, se le adicionaron 0.25 ml de NaOH 5N y 0.4 ml de solución de Tritón-100 al 10% y se midió la absorbancia a 575 nm. La concentración de pigmentos se determinó por comparación con la absorbancia de una solución de hematina ácida al 0.004%. Luego los extractos fueron ajustados a una misma concentración de pigmento (0.001%), por dilución con agua destilada. De esta forma ambos extractos contenían o bien la misma concentración de proteínas o la misma concentración de pigmento.

Mezcla de los extractos con el nitrito.

A 5 ml de los extractos se les adicionó 5 ml de solución de nitrito de sodio de 120 ppm en (nitrito de Sodio) y 5 ml de solución de ácido eritórbito (recién preparado) de 550 ppm. La mezcla se aforó hasta 50 ml con agua destilada. Como control para observar el efecto de los pigmentos se preparó la mezcla anterior pero sin el agregado de extracto.

Los extractos preparados a una misma concentración de pigmento recibieron el mismo tratamiento, sólo que el aforo se llevó a cabo utilizando una solución tampón de fosfato a pH 4, 6 u 8. El nitrito residual (NR) se determinó a intervalos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos para el extracto estandarizado a una misma concentración de proteínas y a los tiempos de reacción de 0, 2, 4, 6, y 24 horas para los extractos estandarizados a una misma concentración de pigmentos.

Determinación del nitrito residual.

El nitrito residual fue determinado siguiendo el método de la AOAC (2) utilizando una solución de sulfanilamida (0.5 g en 150 ml de solución de ácido acético al 15% v/v) y de N(1-naftil)etilendiamina (0.2 g en 150 ml de ácido acético al 15% v/v). La concentración de NR se determinó utilizando una curva patrón de NaNO_2 de concentración conocida desde 5 hasta 20 ppm por dilución simple de una solución madre de NaNO_2 de 100 ppm.

Análisis estadístico

El diseño para medir el efecto del tipo de pigmento y tiempo de reacción sobre el nitrito residual a una misma concentración de proteína, consistió en un arreglo factorial 2x5, siendo los factores los siguientes: tipo de pigmento a 2 niveles (res, ave) y tiempo de reacción a 5 niveles (0, 30, 60, 90 y 120 Min). Para medir el efecto del pH tipo de pigmento y tiempo de reacción sobre los niveles de nitrito residual, se utilizó un arreglo factorial 2x3x5. Los factores fueron tipo de pigmento a 2 niveles (res, ave), pH a 3 niveles (4, 6, 8) y tiempo de reacción a 5 niveles (0, 2, 4, 6, 24). Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados utilizando el procedimiento SAS PROC GLM (25). Los valores promedios de los diferentes tratamientos se compararon utilizando el procedimiento de los mínimos cuadrados (LSD) y Duncan's Multiple Range Test (8) Se aceptaron diferencias significativas para $P < .05$.

Resultados y discusión

El Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos al evaluar los niveles de nitrito residual (NR) en los extractos comparados a una misma concentración de proteínas y a una misma concentración de pigmentos. También se observan en este Cuadro 1 los resultados del NR cuando no se utilizó extracto. El análisis estadístico de los resultados demuestra que el nitrito residual en los tratamien-

tos sin extracto fue significativamente mayor que en los tratamientos con extracto crudo. Al comparar los extractos a una misma concentración de proteína se encontró que el extracto de res fue más eficiente que el extracto de pollo en bajar los niveles de NR. Sin embargo, cuando la comparación se realizó a una misma concentración de pigmento se en-

Cuadro 1. Valores del nitrito residual en los diferentes extractos

Características	Tipo de Extracto		
	pollo	res	sin extracto
Nitrito residual, ppm Igual concentración de proteínas.	5.71 ^a	3.45 ^b	18.00 ^c
Nitrito residual, ppm Igual concentración de pigmento	7.28 ^a	13.04 ^b	19.28 ^c

a,b,c Valores con letras diferentes dentro de una misma fila poseen diferencias significativas ($P < 0.05$)

contró que el extracto de pollo fue más eficiente que el extracto de res.

Los altos valores de NR obtenidos en el tratamiento sin extracto podrían explicarse por el hecho de que en este tratamiento no existe presencia de mioglobina (Mb). En la cadena de reacciones entre el nitrito y la Mb ocurre un acoplamiento entre el óxido nítrico formado por la reducción del nitrito en presencia de eritorbato (agente reductor) y el hierro porfirínico de la Mb para dar origen al cromopigmento denominado nitrosomioglobina (NOMB), el cual es relativamente inestable (9). En experimentos realizados en nuestro laboratorio hemos observado que, a pesar de que el eritorbato reduce inicialmente todo el nitrito hasta óxido nítrico (NO), sí no existe Mb en el medio el NO se redisuelve en el agua y regenera el nitrito mediante una serie de reacciones que aun no han sido claramente establecidas.

Izumi y col. (13) encontraron evidencias de la presencia de un ácido dehidroascórbico como producto de la reacción entre el ascorbato y el nitrito, este último es convertido en NO que posteriormente puede ser transformado en nitrito en una reacción en reversa (7).

La mayor eficiencia observada en el extracto de res (al ser comparado los extractos a una misma concentración de proteína) pudiera deberse a que a la misma concentración de proteína, la carne de res posee una mayor cantidad de Mb (3,5,12). A mayor concentración de Mb cabría esperar un descenso en los valores de NR (17,18)

Lee y col (17), utilizando *longissimus dorsi* como músculo blanco y *trapezius* como músculo rojo de un mismo animal para preparar productos curados encontraron que el NR era menor en los productos con músculo blanco y explicaron este resultado basándose en el menor pH

encontrado en el músculo blanco. Márquez y Salazar (18) trabajando con productos curados elaborados con carnes de diferentes animales (pollo y cerdo), reportaron valores de NR en carne roja significativamente menores que en carnes blancas y atribuyeron estos resultados a la mayor presencia de Mb en las carnes rojas.

La mayor eficiencia demostrada por el extracto de pollo cuando se compararon los extractos a una misma concentración de pigmento hace suponer que la carne blanca posee un sistema mucho más eficiente para la formación del cromopigmento NOMb que las carnes rojas. Este hallazgo pudiera explicar porque, a pesar del alto contenido de Mb en las carnes rojas con respecto a las carnes blancas, los niveles de NR no muestran una tendencia lineal con respecto a la concentración de Mb. Presumiblemente se formó un cromopigmento NOMb mucho más estable en el extracto de pollo que en el extracto de res lo cual explicaría estos resultados. Es importante mencionar que al hacer el ajuste a una misma concentración de pigmento el extracto de pollo siempre posee una mayor concentración de proteínas. Esta mayor cantidad de proteína en el extracto de pollo pudiera también tener algún efecto en los resultados observados. Es necesario, por tanto, realizar ensayos en sistemas modelos más depurados para estudiar este fenómeno e indagar si esta marcada diferencia en la concentración de NR en extractos provenientes de fibras musculares blancas es inhe-

rente a la molécula de Mb en sí o a sistemas alternos que aceleran la reacción de óxido-reducción del nitrito hasta óxido nítrico (NO).

La figura 1 muestra el comportamiento de los extractos a una misma concentración de proteína a diferentes tiempos de reacción. Se observa para ambos extractos un aumento del nitrito residual en la medida que aumenta el tiempo de reacción. Se observa también que en todos los tiempos el aumento es mayor cuando se utiliza el extracto de pollo. El aumento en los niveles de NR en el tiempo indica que la mioglobina independientemente de la especie va perdiendo eficiencia en la medida que transcurre el tiempo de reacción.

El Cuadro 2 muestra los resultados del nitrito residual en extracto de res afectados por el pH y el tiempo de reacción. El análisis estadístico de los resultados demostró que existe una interacción significativa ($P < 0.05$) entre el pH y el tiempo de reacción. En la Figura 2 se presentan los mismos resultados. La interacción se demuestra por la falta de paralelismo entre las líneas. En general se encontró que en presencia del extracto de res los niveles de NR aumentan al aumentar el tiempo de reacción. A pH 4 el máximo nivel de nitrito se encontró en las primeras 2 horas de reacción, mientras que a pH 6 y 8 los máximos niveles de nitrito se encontraron a las 6 h de reacción. Estos resultados demuestran que el efecto del tiempo de reacción depende del pH, lo cual explica la interacción observada.

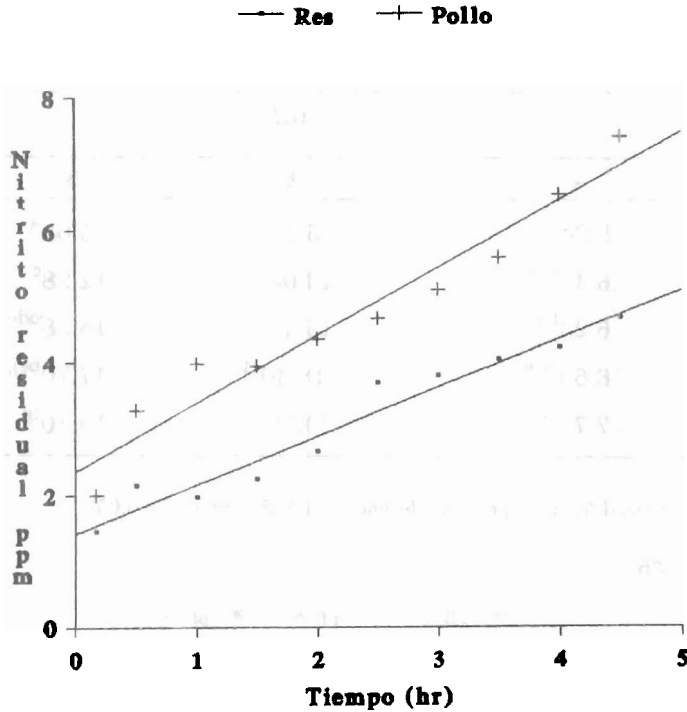


Fig. 1. Eficiencia de los extractos en reducir los niveles de nitrito residual.

Se ha demostrado que al bajar el pH de las carnes se incrementa la velocidad de la formación del color característico del curado (10). Knipe y col (14) reportaron una disminución en la velocidad de formación del color del curado cuando se añadió fosfato para aumentar el pH y la estabilidad de las emulsiones cárnicas. La adición de fosfatos aumentó el NR en "frankfurters" (22) y en productos horneados elaborados con pechugas de pavo (1).

Nuestros resultados indican que inicialmente el pH no afecta los niveles de NR; sin embargo, a medida que transcurre el tiempo de reac-

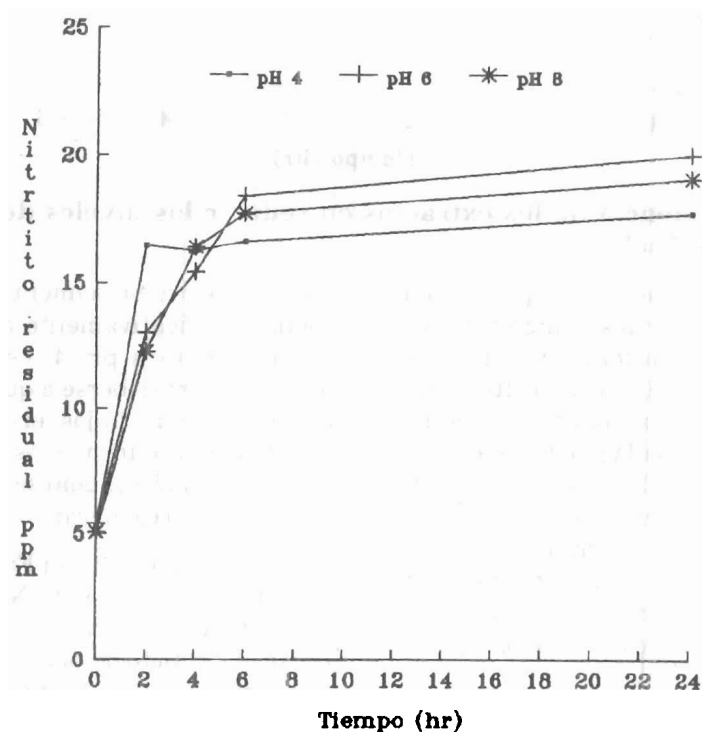
ción se observa, un aumento del NR, siendo significativamente mayor en el tratamiento a pH 4, este incremento pudiera deberse a que a niveles de pH muy bajos el complejo NOMB de res se torne inestable, dejando libre el NO el cual se redisuelve en el agua, regenerando el nitrito.

En el Cuadro 3 y la Figura 3 se muestran los valores de NR debido al pH y tiempo de reacción cuando se utilizó el extracto de pollo. Se observa, al igual que con el extracto de res que existe interacción indicando que el aumento del nitrito residual con el tiempo depende del pH.

Cuadro 2. Valores promedio del nitrito residual en extracto de res afectados por el pH y tiempo de reacción

Tiempo, h	pH		
	4	6	8
0	5.24 ^a	5.39 ^a	5.04 ^a
2	16.45 ^{bde}	13.04 ^c	12.28 ^c
4	16.23 ^{bd}	15.43 ^{dc}	16.38 ^{bde}
6	16.60 ^{bde}	18.40 ^{ef}	17.70 ^{beg}
24	17.73 ^{beg}	20.03 ^f	19.10 ^{fg}

^a. Valores con letras diferentes poseen diferencias significativas ($P < 0.05$).

**Fig. 2. Valores del nitrito residual en extracto de res afectados por el pH y tiempo de reacción**

Cuadro 3. Valores promedio del nitrito residual en extracto de pollo afectados por el pH y tiempo de reacción.

Tiempo, (h)	pH		
	4	6	8
0	5.62 ^{ab}	5.86 ^{ab}	4.98 ^a
2	6.22 ^{abc}	7.28 ^{bcd}	9.95 ^e
4	6.92 ^{abcd}	7.65 ^{bcd}	12.52 ^g
6	7.85 ^{cd}	8.65 ^{de}	13.55 ^{gh}
24	10.55 ^e	9.98 ^e	15.58 ^h

^{a-h} Valores con letras diferentes poseen diferencias significativas (P < 0.05).

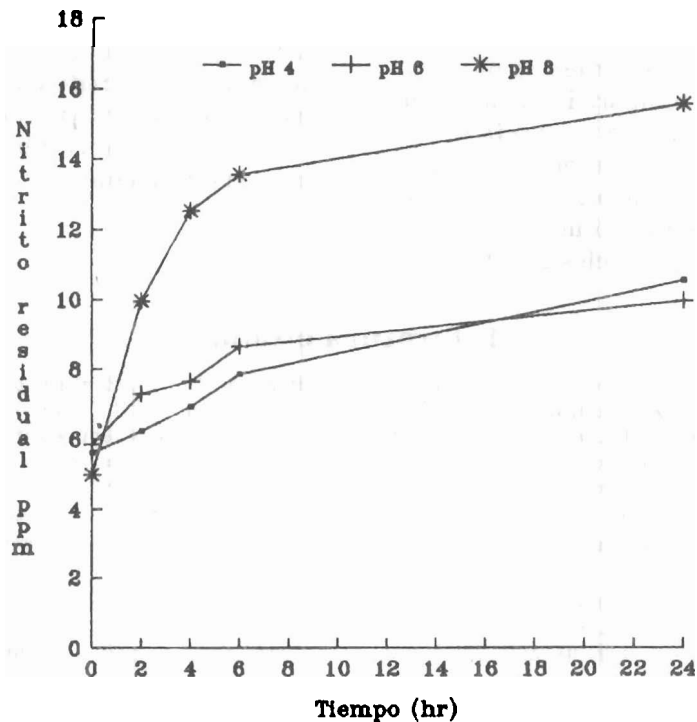


Fig. 3. Valores del nitrito residual en extracto de pollo afectados por el pH y tiempo de reacción

No se encontró diferencias en el aumento del NR debido al tiempo de reacción cuando se compararon los tratamientos a pH 4 y 6. Sin embargo, a pH 8 se evidencia un aumento significativo de los niveles de NR a partir de las dos primeras horas de reacción. Nuevamente observamos una dependencia en la eficiencia de

la reacción con respecto al pH. Sin embargo, el extracto de pollo muestra una menor sensibilidad a los cambios de pH. Solamente a pH 8 muestra una diferencia significativamente mayor, lo que se traduce en una tendencia a disminuir la eficiencia de la reacción del NO con la Mb en esta zona de pH.

Conclusiones

La presencia de pigmento es importante para disminuir los niveles de nitrito residual. El eritorbato reduce los niveles de nitrito, pero al no existir la presencia de pigmento el nitrito vuelve a regenerarse.

Los extractos de carne de res demostraron ser más eficientes que los extractos de carne de pollos cuando fueron comparados a la misma concentración de proteína; pero cuando se compararon a una misma concentración de pigmento el extracto de pollo mostró mayor eficiencia en reducir los niveles de nitrito.

Es necesario realizar ensayos en sistemas modelos más depurados para tratar de explicar la mayor eficiencia del extracto de pollo en mantener niveles bajos de nitrito. Los resultados de este estudio tienen particular importancia en la industria del procesamiento de carnes curadas, especialmente por la relación que se ha demostrado entre la presencia de sales de nitrito y formación de sustancias cancerígenas tales como las nitrosaminas.

Literatura citada

1. Alley, G., D. Cours and D. Demeyers. 1992. "Effect of nitrate, nitrite and ascorbate on colour and colour stability of dry, fermented sausage prepared using 'back slopping'" *Meat Sci.* 32:279.
2. A.O.A.C. 1990. *Official Methods of Analysis "14th" ed.* Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
3. Ashmore, C. R., G. Tompkins, and L. Doerr. 1972. "Postnatal development of muscle types in domestic animals" *J. Ani. Sci.* 34:37.
4. Ashmore, C. R. 1974. "Phenotypic expression of muscle fiber type and some implications to meat quality" *J. Anim. Sci.* 38:1158.
5. Barnard, J. R., V. R. Edgerton, T. Furukawa and J.B. Peter. 1971. "Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers" *Amer. J. Physiol.* 220:410.
6. Beecher, G. R., R. G. Cassens, W. G. Hoekstra and E. J. Briskey. 1968. "Red and white fiber content and associated post-mortem properties of seven porcine muscle" *J. Food Sci.* 33:84.
7. Borenstein, B. 1976. "Potentiation of ascorbate effect in cured meat pigment development" *J. Food Sci.* 41:1054.
8. Duncan, D. B. 1955. "Multiple range and multiple F test" *Biometrics* 11:1.

9. Fox, J. B. and J.S. Thomson. 1963. "Formation of bovine nitrosylmyoglobin. J. Food Sci. 45:1321.
10. Fox, J. B. 1966. "The chemistry of meat pigments" J. Agric. Food Chem. 14:207.
11. Fox, J. B., and S. A. Ackerman. 1968. "Formation of nitric oxide myoglobin: Mechanisms of the reaction with various reductants" J. Food Sci. 33:364.
12. Hultin, H. O. 1985. "Characteristics of muscle tissue" in Fenema, O. R. (ed) "Food chemistry" 2nd edition, Marcel Dekker publisher, N.Y.
13. Izumi, K., R. G. Cassens, and M. L. Greaser. 1989. "Reaction of nitrite with ascorbic acid and its significant role in nitrite-cured food" Meat Sci. 6:141.
14. Knipe, C. L., D. G. Olson and R. E. Rust. 1988. "Effects of inorganic phosphates and sodium hydroxide on the cooked cured color, pH and emulsion stability of reduced-sodium and conventional meat mulsions" J. Food Sci. 53:1305.
15. Lawrie, R. A. 1950. "Some observations on factors affecting myoglobin concentration in muscle" J. Agric. Sci. 40:356.
16. Lechowich, R., W. Brown, R. Deibel and I. Somers. 1979. "The role of nitrite in production of canned-cured meat products" Meat Sci. 31:213.
17. Lee, S. H., R. G. Cassens, and O. R. Fenema. 1976. "Effect of muscle type on residual nitrite in cured meat" J. Food Sci. 41:100.
18. Márquez S, E., y A. Salazar. 1991. "Efecto de diferentes niveles iniciales de nitrito y tipo de fibra en algunas característi-
cas de productos curados" Revista Científica FCV de LUZ 1:35.
19. Marriott, N. G., R. V. Lechowich and M. D. Pierson. 1981. "Use of nitrite and nitrite-sparing agents in meats: a review" J. Food Protect. 44:881.
20. Moody, W. G., and R. G. Cassens. 1968. "Histochemical differentiation of red and white muscle fibers" J. Ani. Sci. 27:961.
21. Möhler, K. 1982. "El curado" 1era edición en español, edit Acribia, Zaragoza, España. pp 1-98.
22. Prusa, K. J. and K. K. Kregel. 1985. "Effect of muscle type and sodium tripolyphosphate on residual nitrite, pH, color, and instron measurement of turkey frankfurters" Poultry Science 64:2165.
23. Rawn, J. D. 1989. "Bioquímica" 1era edición. Editorial Mcgraw Hill Interamericana. Madrid, España. pp 121-147.
24. Rust, R. E., D. G. Olson. 1973. "Meat curing principles and modern practice" Köch Supplies inc. USA.
25. SAS. 1985. SAS User's Guide Statistics (5th Ed.) SAS Institute Inc., Carry, N.C.
26. Trout, G. R. 1990. "The rate of metmyoglobin formation in beef, pork, and turkey meat as influenced by pH, sodium chloride, and sodium tripolyphosphate" Meat Sci. 28:203.
27. Warris P. D. 1979. The extraction of haem pigments from fresh meat. J. Food Technol. 14:75.