

# Determinación de nitritos en chorizos por espectrofotometría derivativa, utilizando un sistema de análisis en flujo

*Máximo Galignani\*, Lyda Castellanos, Maribel Valero  
y María del Rosario Brunetto*

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (ULA),  
apartado postal 440, Mérida 5101-A, Venezuela.*

Recibido: 13-06-07 Aceptado: 12-02-08

## Resumen

En el presente trabajo se diseñó un método de análisis para la determinación de nitritos en productos cárnicos (chorizos), que utiliza un sistema acoplado de análisis en flujo (AF) con detección espectrofotométrica basada en la reacción de Shinn. El sistema permite la adquisición de espectros de absorción en continuo con un espectrofotómetro convencional dispersivo, utilizando el blanco químico como referencia. Se seleccionó como criterio de medida el máximo a 590 nm de la derivada de segundo orden del espectro de absorción, que permite eliminar las interferencias espectrales de matriz. Se estudió el efecto de parámetros espectroscópicos del sistema AF y de la reacción química sobre la señal analítica. La optimización del sistema se realizó por el método univariado. Las figuras de mérito (rango lineal hasta  $1,5 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ ; límites de detección ( $3\sigma$ ) y cuantificación ( $10\sigma$ ) de  $0,004$  y  $0,015 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente; precisión menor al 1%, y frecuencia de medida de  $30$  muestras  $\text{h}^{-1}$ ) son apropiadas para el análisis propuesto. Los estudios de recuperación y adición estándar corroboraron la exactitud del método que se aplicó al análisis de chorizos.

**Palabras claves:** nitritos, espectroscopia derivativa, análisis en flujo, espectrofotometría, chorizos.

## Derivative spectrophotometric determination of nitrite in sausages, using a flow analysis system

### Abstract

In this work, a flow analysis (FA) derivative spectrophotometric method, based on the Shinn reaction, has been developed for the determination of nitrite in sausages. The system allows the acquisition of the absorption spectra in a continuous mode with a conventional spectrophotometer, using the chemical blank as a reference. The peak at 590 nm of the second order derivative spectra was selected as a measurement criterion, in order to avoid the spectral matrix interference. The effect of different spectroscopic, instrumental, flow analysis, and chemical reaction parameters on the analytical signal was evaluated. The optimization of the system was carried out by the univariate method. The main figures of merit (linear range up to  $1.5 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ ; limits of detection ( $3\sigma$ ) and quantification ( $10\sigma$ ) of  $0.004$  and  $0.015 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively;

\* Autor para la correspondencia. E-mail: maximo@ula.ve

precision lower than 1%, and sample frequency of 30 samples h<sup>-1</sup>), are appropriate for the proposed analysis. The recovery and standard addition studies showed the proposed method as accurate. The method was applied to the determination of nitrite in sausages (chorizos).

**Key words:** nitrite, derivative spectroscopy, flow analysis, sausages (chorizos), Spectrophotometry.

## Introducción

El nitrito de sodio (o potasio), al igual que los correspondientes nitratos, se utiliza de forma extensiva en el proceso de curado de muchos productos cárnicos, ya que el ión nitrito inhibe el desarrollo anaeróbico de ciertos microorganismos, especialmente del *Clostridium botulinum*, que ayuda a fijar el color en las carnes rojas y contribuye al desarrollo de las características organolépticas del producto (1). Los nitratos presentes en los productos cárnicos se reducen a la forma de nitritos por acción de bacterias que se desarrollan en ese medio, mientras los nitritos son parcialmente reducidos a la forma de NO, compuesto que reacciona con la mioglobina y por esta vía es el responsable de la coloración típica de las carnes curadas. Sin embargo, en la actualidad, está bien documentado el efecto perjudicial y tóxico que ejercen los nitritos sobre la salud (2-4).

El nitrito es responsable de la metahe-moglobinemia y es un importante precursor en la formación de las N-nitrosaminas, muchas de las cuales son cancerígenas y mutagénicas (1, 2). Por esta razón, las legislaciones actuales de muchos países restringen el contenido de nitratos y, especialmente, de nitritos en los alimentos. La legislación venezolana establece un límite en el contenido total de ambos iones en productos cárnicos de 180 µg g<sup>-1</sup>, expresado bajo la forma de nitritos (5). Por todo lo expuesto, es evidente que se requieren métodos analíticos accesibles, válidos y viables para el control de calidad de este parámetro.

En la literatura se encuentran descritos una gran cantidad de métodos para la determinación de nitritos, muchos de los cuales han sido incluidos en algunos artícu-

los de revisión (6-8). Sin embargo, en la actualidad, la mayoría de los métodos propuestos son espectrofotométricos y se fundamentan en diversas variantes de la reacción de Griess-Ilosvay, especialmente la reacción de Shinn.

La base de estos métodos es una reacción química en la que interviene el ión nitrito para generar un compuesto tipo azo, intensamente coloreado, cuyo máximo de absorción se encuentra en el visible (8-10). Muchas de estas propuestas metodológicas se han desarrollado en sistemas de análisis por inyección en flujo (AIF) en las que se monitorea la absorbancia en el máximo de absorción, lo que ha permitido, con relativa facilidad, su automatización. Sin embargo, esta estrategia pierde su vigencia en el análisis de aquellas muestras que presentan interferencias espectrales por parte de la matriz. Para estos casos, la espectroscopia derivativa puede ofrecer soluciones simples, directas y válidas desde el punto de vista analítico (11-15). No obstante, para desarrollar esta estrategia, es indispensable disponer del espectro de absorción. El espectro de absorción permite, entre otras opciones: i) corregir la absorbancia en el máximo de absorción por desplazamientos del espectro respecto a la línea de base, ii) observar desplazamientos en el máximo de absorción, iii) observar de forma clara la presencia de interferencias de matriz, iv) seleccionar diversos criterios de medida, y v) el desarrollo de estrategias fundamentadas en la espectroscopia substractiva, la espectroscopia derivativa o en ambas.

El principal objetivo de este trabajo fue diseñar –y desarrollar– un sistema acoplado de análisis en flujo con detección por espectroscopia derivativa de absorción molecular en el visible (AF-EDAM-Vis), simple y accesi-

ble, que permita la adquisición rápida de los espectros de absorción en una modalidad continua, utilizando un espectrofotómetro convencional de tipo dispersivo. Esta condición es fundamental para poder desarrollar estrategias fundamentadas en la espectroscopia derivativa. El método se aplicó a la determinación de nitritos en productos cárnicos (chorizos).

## Materiales y métodos

### Instrumentación

La figura 1 muestra el diagrama esquemático del montaje AF-EDAM-Vis utilizado, que consiste básicamente en el acoplamiento de un sistema simple de análisis en flujo con un espectrofotómetro convencional de doble haz que se ensambló a partir de equipos y accesorios comerciales. Consta de una bomba peristáltica (P) de cuatro canales, Ismatec IPC; tubería de Tygon para la propulsión del portador ( $C_p$ ); las muestras y estándares ( $C_M$ ) y los diversos reactivos ( $C_{Sul}$  y  $C_{Ned}$ ); dos serpentines de reacción de PTFE ( $R_1$  y  $R_2$ ); dos microceldas de flujo con un volumen interno de 160  $\mu\text{L}$  y un paso óptico de 1 cm ( $CF_T$  y  $CF_{Ref}$ ), que actúan como celda de trabajo y de referencia, respectivamente; y un espectrofotómetro Perkin Elmer (PE), modelo Lambda 20. El sistema incluye un canal adicional ( $C_{Ref}$ ), también propulsado por P, que permite la recirculación de la solución de referencia a

través de un circuito cerrado (figura 1) y una válvula selectora (VS) que permite la introducción selectiva de la solución portadora (posición 1) o las muestras o estándares (posición 2) en el sistema. Los espectros de absorción se adquieren en una modalidad continua (entre 680 nm y 440 nm) a una velocidad de barrido de 960  $\text{nm min}^{-1}$  y una resolución de 1 nm. El instrumento, así como el procesamiento de los datos espectrales, se controla a través de un computador personal equipado con el *software* WinLab de PE.

### Reactivos y muestras

Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de grado analítico, y se utilizó agua ultrapura (indicada en el texto con las siglas AD) suministrada por un sistema Milli-Q TOC (Millipore).

Se preparó 1 L de una solución patrón de nitrito (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) a partir de nitrito de sodio secado previamente en una estufa durante 5 horas a 110°C. A esta solución se le añadió 1 g de NaOH para prevenir la liberación de ácido nitroso y, tras el enrase, 1 mL de cloroformo (grado espectroscópico) para prevenir el desarrollo bacteriano. Las soluciones de trabajo (estándares) se prepararon diariamente por dilución adecuada del patrón en AD. La solución de sulfanilamida (SUL: 0,25% p/v) se preparó disolviendo 1,25 g de SUL en 25 mL de HCl concentrado, diluyendo hasta 500 mL con agua destilada.

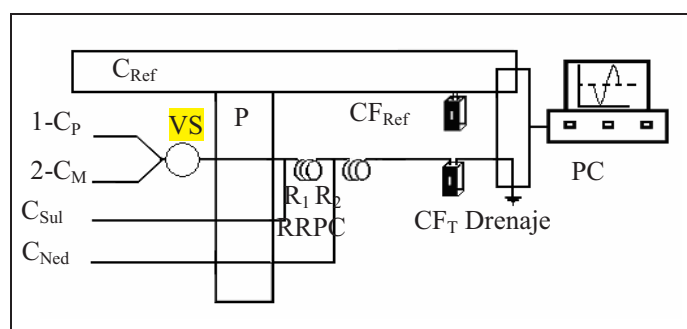


Figura 1. Diagrama esquemático del sistema AF-EDAM-Vis desarrollado. P: bomba peristáltica;  $C_p$ : portador (agua);  $C_M$ : muestra (estándar);  $C_{Sul}$ : sulfanilamida;  $C_{Ned}$ : NED;  $C_{Ref}$ : solución de referencia; VS: válvula selectora manual;  $R_1$ - $R_2$ : serpentines de reacción;  $CF_T$ ,  $CF_{Ref}$ : celdas de flujo de trabajo y referencia.

Por su parte, la solución de N-(1-Naftil)-etilendiamina (NED: 0,5% p/v) se preparó disolviendo 2,50 g del reactivo en agua y llevándola a aforo con el mismo solvente hasta los 500 mL. Estos reactivos, conservados en botellas ámbar y bajo refrigeración, son estables, al menos, por un mes.

El blanco químico del sistema, la solución que resulta de la mezcla del portador y las soluciones de SUL y NED en la configuración que se ilustra en la Figura 1, se recoge al comienzo de la sesión de trabajo a la salida de la celda ( $CF_T$ ) durante la etapa en la que se introduce el portador de forma continua en el sistema. Esta solución, al igual que su espectro de absorción, es estable durante las primeras doce horas.

Diez diferentes tipos de chorizo producidos artesanalmente en la ciudad de Mérida, Venezuela, fueron adquiridos en expendios de alimentos de la ciudad y analizados por el método propuesto. Las muestras fueron procesadas siguiendo la norma 973.31 de la AOAC (16), que básicamente establece el tratamiento de la muestra con agua caliente a 80 °C. La muestra es inicialmente triturada y homogeneizada en un procesador de alimentos. Luego, 10 g de muestra (húmeda) procesada se colocan con 50-60 mL de agua caliente en un *beaker* de 400 mL, se homogeneiza la mezcla y se somete al protocolo recomendado: el vaso de precipitado se coloca en un baño de María a 80°C, se añaden 250 mL de agua y se deja digerir la mezcla por 2 horas. A continuación, la muestra digerida se filtra, se añaden unas gotas de NaOH 1 M y se lleva a aforo hasta los 500 mL con AD. Tras el enrase, se añade 1 mL de cloroformo. En este punto la solución está lista para ser analizada. Se procesaron varias muestras en paralelo para minimizar el impacto de esta etapa sobre el tiempo de análisis.

Una fracción de las muestras procesadas se secó mediante liofilización (para determinar el contenido de humedad), y en un procedimiento alternativo se repitió el pro-

cedimiento, pero tomando como base 5 g de la muestra procesada seca.

### Procedimiento de análisis

Para iniciar el sistema, VS se coloca en la posición 1 (figura 1) para introducir el portador. En esta etapa preliminar se define la señal de fondo (*background*), y a continuación se adquiere el espectro de referencia del sistema (blanco). En este punto, el sistema está listo para comenzar el protocolo de trabajo.

El sistema opera en tres etapas: i) introducción de la muestra, ii) adquisición del espectro de absorción y iii) etapa de limpieza (13-14). En la primera etapa, VS se coloca en la posición 2 para introducir la muestra (estándar) en el sistema. De esta forma, la solución que contiene el analito en su recorrido hacia la celda de trabajo se mezcla y reacciona con la SUL en el serpentín de reacción  $R_1$  y la solución resultante lo hace con el NED en  $R_2$ , donde finalmente se produce el azo compuesto característico de la reacción de Shinn. Por último, esta solución se dirige hacia  $CF_T$  y, finalmente, va al drenaje. En este punto, se adquiere el espectro de absorción correspondiente (secuencia 2) en una modalidad continua, realizando tres barridos de forma secuencial e independiente.

El tiempo mínimo necesario para que la solución haga el recorrido descrito, desde su introducción al sistema, es de unos 20 s. Sin embargo, el tiempo de introducción de la muestra, previo a la adquisición de los espectros, se fijó en 30 s con el fin de asegurar una composición homogénea de la solución resultante y, con ello, la máxima señal analítica.

Antes de introducir al sistema una nueva muestra (o estándar), se recomienda realizar una etapa de limpieza (secuencia 3). Para lograr este propósito, VS se vuelve a colocar en la posición 1 para introducir agua al sistema durante unos 20 o 25 s. De esta forma se limpia el sistema y se evitan los indeseables efectos de memoria (*carry over*). En

este punto, el sistema está preparado para la introducción de una nueva muestra.

El tiempo necesario para completar el ciclo de medida de cada muestra o estándar es del orden de los 2 minutos.

## Resultados y discusión

### Estudio espectral del sistema

En la literatura se han descrito diversos métodos espectrofotométricos para la determinación de nitritos en productos alimenticios que tienen su base en la reacción de Shinn (6-10). Sin embargo, en algunos productos cárnicos, como los chorizos, la matriz de la muestra puede generar interesantes problemas analíticos: interferencias de tipo espectral.

La figura 2A muestra en forma comparativa los espectros correspondientes a las especies químicas relacionadas con el sistema bajo estudio (blanco, muestras y estándares). El blanco del sistema (figura 2A-a) es transparente en la región comprendida entre 400 y 700 nm, mientras que el azo compuesto que se genera durante la reacción de Shinn muestra una banda de absorción simétrica y ensanchada entre 425 y 625 nm (figura 2A-b), con un máximo bien definido en 542 nm. En contraste, la solución de la muestra de chorizo absorbe en todo el intervalo estudiado, mostrando una banda ensanchada entre 435 y 625 nm, con un máximo en 515 nm y dos hombros localizados en 545 y 480 nm, respectivamente (figura 2A-c). Esto evidencia la presencia de una interferencia espectral clásica, que se origina

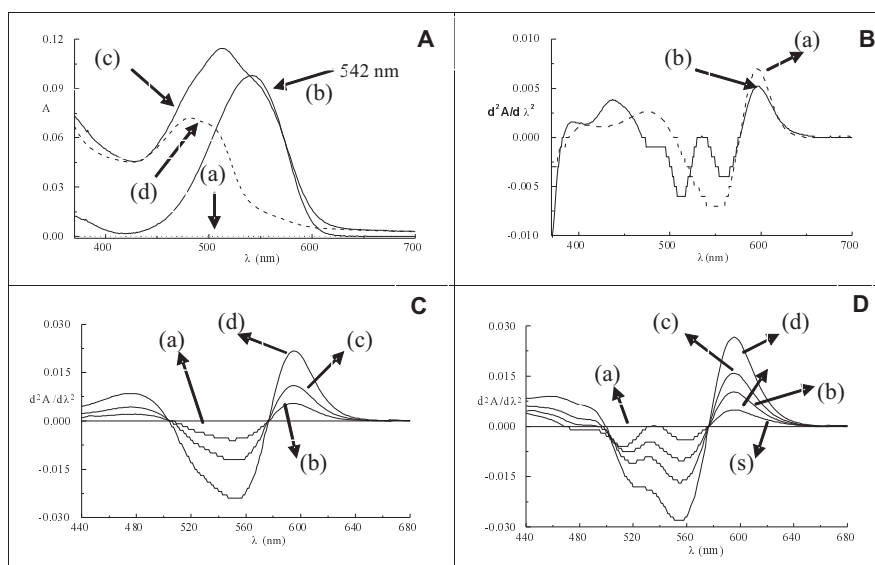


Figura 2. (A) Comparación de los espectros de absorción de reactivos, estándares y muestras. (a): blanco, (b): estándar ( $0,3 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ ), (c): muestra ( $0,25 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ ). La figura A-(d) corresponde al espectro de absorción de la solución de la muestra obtenido en ausencia de la reacción de Shinn. (B) Derivada de segundo orden ( $D^2$ ) de los espectros de absorción correspondientes a: (a) estándar ( $0,3 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ : figura 2A-b) y (b) muestra ( $0,25 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ : figura 2A-c). (C) Espectros  $D^2$  correspondientes a una calibración simple típica: (a) 0, (b) 0,25, (c) 0,50 y (d) 1,0  $\mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ . (D) Espectro  $D^2$  correspondientes a una curva de adición de estándar: (a) 0, (s) muestra ( $0,25 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ ), y la misma muestra enriquecida con: (b) 0,25, (d) 0,50 y (d) 1,0  $\mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ .



por la superposición de las bandas de absorción del compuesto azo con las correspondientes a la matriz de la muestra. De esta forma, el primer hombro tiene su origen, evidentemente, en la contribución del azo compuesto, mientras que el segundo debe ser atribuido exclusivamente a la matriz.

Es importante destacar que todas las soluciones de las muestras que se obtuvieron tras el procesamiento de los chorizos presentaron una coloración rosado-rojiza en su estado natural (en ausencia de reacción de Shinn), cuyo espectro presenta un máximo en 480 nm, como se observa en la figura 2A-d. Sin embargo, la intensidad en la coloración varía con la muestra. La coloración incrementa su intensidad cuando se aumenta la masa de muestra utilizada en la preparación de las soluciones. Este comportamiento puede tener su justificación en la presencia de colorantes hidrosolubles que se incorporan en la producción de este tipo de productos cárnicos, cuya concentración y tipo varía según el productor.

La espectroscopia derivativa ha sido muy utilizada dentro de la espectroscopia de absorción molecular (ultravioleta, visible e infrarrojo) para solventar este tipo de inconvenientes (11-13). En este caso particular, el uso de la derivada de segundo orden del espectro de absorción ( $d^2A/d\lambda^2$ , que se indica en el texto como  $D^2$ ) permite separar con claridad la señal del analito, como se observa en la figura 2B, donde se presentan los espectros  $D^2$  del estándar y la muestra previamente descritos. En este caso particular, el máximo (el pico) a 590 nm del espectro  $D^2$  aparece como una señal analítica clara, limpia y libre de interferencias. Este comportamiento se ratifica en las figuras 2C y 2D, donde se observan los espectros  $D^2$  correspondientes a una calibración típica entre 0 y 1  $\mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$  y a una calibración por adición de estándar que utiliza como base la solución de la muestra M2 con un contenido de  $\text{NO}_2^-$  de 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y la misma muestra enriquecida con nitritos en el intervalo de 0 a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### Selección de las condiciones de operación del sistema de análisis

La puesta a punto del sistema se llevó a cabo por el método univariado. Para esto se optimizaron o seleccionaron diversos parámetros espectroscópicos (intervalo espectral, velocidad de barrido, resolución nominal, etc.) del sistema AF (configuración, caudal de los diversos canales, etc.) y relacionados con la reacción de Shinn (concentración de reactivos, longitud de los serpentines de reacción, etc.) (15). Las condiciones de trabajo seleccionadas se resumen en la tabla 1.

### Caracterización analítica y validación de la propuesta metodológica

El sistema propuesto, bajo las condiciones experimentales seleccionadas (ver tabla 1), se caracterizó analíticamente en términos de: respuesta lineal (hasta 1,5  $\mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$ ; tabla 2); límites de detección ( $3\sigma$ : 0,004<sub>5</sub>  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y cuantificación ( $10\sigma$ : 0,015  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); y precisión del sistema de medida –expresada por la desviación estándar relativa (DER)– menor de 1% (0,7% para estándares ( $[\text{NO}_2^-] = 0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $n=5$ ) y 0,9% para muestras ( $[\text{NO}_2^-]_{\text{M1}} = 0,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $n=5$ )). La precisión del método completo, incluida la preparación de la muestra, se evaluó preparando cinco soluciones de la muestra M2 de forma independiente, y fue de 1,8%. Por último, la frecuencia de análisis –o de medida– (sin tomar en cuenta la preparación de las muestras) fue del orden de 30 muestras por hora.

Se realizaron curvas de adición de estándar con las soluciones de las muestras de chorizo M1 y M2, con contenidos endógenos de nitrito de 0,55  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, siguiendo el procedimiento que se describe en la tabla 2. Las pendientes de estas curvas no mostraron diferencias significativas con respecto a la curva de calibración simple, lo que indica la ausencia de interferencias por parte de la matriz.

La exactitud del procedimiento propuesto se evaluó mediante estudios de recu-

Tabla 1  
Condiciones de operación del sistema AF-EDAM-Vis.

| Condiciones instrumentales-espectroscópicas                           |   |
|---|---|
| Parámetro   | Valor o condición seleccionado  |
| Microcelda de flujo ( $CF_T$ y $CF_{Ref}$ )                           | Microcelda de flujo (cuarzo)<br>Volumen interno = 160 $\mu$ l, b = 10 mm  |
| Intervalo espectral   | 680-440 nm  |
| Velocidad de barrido  | 960 nm $\text{min}^{-1}$  |
| Resolución nominal  | 1 nm  |
| Criterio de medida  | Valor máximo (pico) a 590 nm de la derivada de segundo orden (ventana de 21 puntos) del espectro de absorción correspondiente a la banda de 542 nm. |
| Condiciones relacionadas con el sistema AF y con la reacción de Shinn |   |
| Parámetro   | Valor o condición seleccionado  |
| Composición del portador ( $C_p$ ):                                   | Agua destilada  |
| Caudal ( $C_p$ ):   | 1,0 mL $\text{min}^{-1}$  |
| Concentración de SUL ( $C_{Sul}$ )*:                                  | SUL <sup>(a)</sup> : 0,25% (p/v) en HCl 5% (v/v)  |
| Caudal ( $C_{Sul}$ )  | 1,0 mL $\text{min}^{-1}$  |
| Concentración de NED ( $C_{Ned}$ )*:                                  | NED <sup>(b)</sup> : 0,5% (p/v)   |
| Caudal ( $C_{Ned}$ )  | 1,0 mL $\text{min}^{-1}$  |
| Estándares ( $C_M$ ):   | $[\text{NO}_2^-] = 0,02-1,5 \mu\text{g NO}_2^- \text{ mL}^{-1}$   |
| Composición de la muestra ( $C_M$ ):                                  | Ver sección 2.3   |
| Caudal ( $C_M$ ):   | 1,0 mL $\text{min}^{-1}$  |
| Solución de referencia ( $C_{Ref}$ ):                                 | Sul/Ned/Agua  |
| Caudal ( $C_{Ref}$ ):   | 3,0 mL $\text{min}^{-1}$  |
| Longitud del serpentín de reacción ( $R_1$ )                          | PTFE 30 cm (0,8 mm i.d)   |
| Longitud del serpentín de reacción ( $R_2$ )                          | PTFE 30 cm (0,8 mm i.d)   |

<sup>(a)</sup> SUL: Sulfanilamida; <sup>(b)</sup> NED: N-(1-naftil) etilendiamino dihidrocloruro.

Muestras\*: en la preparación de las muestras se utilizaron 10 g de chorizo en base húmeda (5 g de base seca) y se llevaron a un volumen final de 500 mL. El subíndice (s) en las muestras M1 y M2 indica que fueron preparadas sobre la base seca (muestra liofilizada). Las muestras M1<sup>(a)</sup> y M2<sup>(a)</sup> corresponden a soluciones de las muestras M1 y M2, con concentraciones de 0,55 y 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . <sup>(b)</sup> Valor medio  $\pm$  desviación estándar de 5 medidas independientes. (CCS): Curva de calibración simple. (CAE): Curva de adición de estándar. D<sup>2</sup> corresponde al valor máximo (pico) a 590 nm de la representación espectral D<sup>2</sup>;  $[\text{NO}_2^-]$ , a la concentración de nitritos expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; y (r), al coeficiente de correlación de la serie de puntos. En todos los casos, las curvas de adición de estándar se prepararon añadiendo a 50 mL de la solución de la muestra cantidades conocidas de  $\text{NO}_2^-$  en el intervalo de 0 a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y llevándola a aforo hasta los 100 mL con AD.

Tabla 2  
Análisis de muestras reales.

| Muestras*<br>(chorizos) | Humedad<br>(%) | [NO <sub>2</sub> ] (µg g <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup> |            |            |
|-------------------------|----------------|---|------------|------------|
|                         |                | Base<br>húmeda  | Base seca  | Base seca  |
|                         |                | (CCS)   | (CCS)      | (CAE)      |
| M1 <sup>(a)</sup>       | 52,50          | 27,5 ± 0,4  | 57,9 ± 0,8 | 58,1 ± 0,9 |
| M1 <sub>(s)</sub>       |                |   | 57,6 ± 0,7 |            |
| M2 <sup>(a)</sup>       | 53,50          | 12,5 ± 0,2  | 26,9 ± 0,6 | 27,1 ± 0,6 |
| M2 <sub>(s)</sub>       |                |   | 27,0 ± 0,5 |            |
| M3                      | 46,50          | 45,5 ± 0,5  | 85 ± 1     |            |
| M4                      | 47,51          | 42 ± 1  | 80 ± 2     |            |
| M5                      | 47,95          | 57 ± 1  | 110 ± 2    |            |
| M6                      | 49,81          | 32,9 ± 0,4  | 65,6 ± 0,9 |            |
| M7                      | 51,13          | 14,3 ± 0,2  | 29,3 ± 0,4 |            |
| M8                      | 50,28          | 17,4 ± 0,4  | 35,0 ± 0,8 |            |
| M9                      | 45,32          | 9,3 ± 0,2   | 17,0 ± 0,5 |            |
| M10                     | 46,93          | 7,7 ± 0,1   | 15,5 ± 0,2 |            |

Información sobre: curva de calibración simple (CCS) y curvas de adición de estándar (CAE).

CCS:  $D^2_{590\text{ nm}} = 2 \cdot 10^{-5} + 0,0253 [\text{NO}_2]$  ( $r = 0,9989$ ) Blanco y siete (7) estándares

CAE:  $D^2_{M1} = 0,0072 + 0,0256 [\text{NO}_2]$   
( $r = 0,9989$ )

CAE:  $D^2_{M2} = 0,0032 + 0,0255 [\text{NO}_2]$   
( $r = 0,9991$ )

Muestras\*: en la preparación de las muestras se utilizaron 10 g de chorizo en base húmeda (5 g de base seca) y se llevaron a un volumen final de 500 mL. El subíndice <sub>(s)</sub> en las muestras M1 y M2 indica que fueron preparadas sobre la base seca (muestra liofilizada). Las muestras M1<sup>(a)</sup> y M2<sup>(a)</sup> corresponden a soluciones de las muestras M1 y M2, con concentraciones de 0,55 y 0,25 µg mL<sup>-1</sup>. <sup>(b)</sup> Valor medio ± desviación estándar de 5 medidas independientes. (CCS): Curva de calibración simple. (CAE): Curva de adición de estándar. D<sup>2</sup> corresponde al valor máximo (pico) a 590 nm de la representación espectral D<sup>2</sup>; [NO<sub>2</sub>], a la concentración de nitritos expresada en µg mL<sup>-1</sup>; y (r), al coeficiente de correlación de la serie de puntos. En todos los casos, las curvas de adición de estándar se prepararon añadiendo a 50 mL de la solución de la muestra cantidades conocidas de NO<sub>2</sub> en el intervalo de 0 a 1 µg mL<sup>-1</sup> y llevándola a aforo hasta los 100 mL con AD.

peración. Para ello, las soluciones usadas en las curvas de adición de estándar se analizaron bajo esta óptica. Los resultados obtenidos (97,2-103,1%) indican que en todos los casos la recuperación fue cuantitativa. Adicionalmente se realizó una experiencia añadiendo concentraciones de analito equivalentes (concentración de nitrito en la solución final entre 0 y 1 µg mL<sup>-1</sup>) a la muestra homogeneizada antes del proceso de extrac-

ción. Nuevamente la recuperación (94,5-102,9%) fue cuantitativa, ratificando la ausencia de efectos interferentes por parte de la matriz. Por otra parte, la concentración de nitritos evaluada en esas muestras por vía de la curva de calibración simple y por adición de estándar (tabla 2) no mostró –en ningún caso– diferencias estadísticamente significativas, condición que ratifica la exactitud del método.



### Análisis de muestras reales

Las muestras descritas en la sección *Reactivos y muestras* fueron analizadas por el método desarrollado, y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2. La gran diferencia que se evidencia en el contenido de nitritos en las muestras estudiadas ( $15,5-110 \mu\text{g g}^{-1}$ , base seca) puede tener dos causas: (i) la concentración de nitrito añadida en la producción del producto y (ii) el tiempo transcurrido entre la producción y su análisis.

El primer aspecto se justifica por cuanto estos productos se preparan, por lo general, de forma artesanal y, además, la receta varía con el productor. En referencia a la segunda, está bien documentado que la concentración de nitritos añadida inicialmente decrece en forma importante con el tiempo por procesos internos que conducen a la reducción de nitritos a otras formas nitrogenadas (15, 17).

En relación con el tratamiento inicial de la muestra, se estudió el efecto de la liofilización en el procedimiento de preparación de la solución de la muestra. Los resultados obtenidos no revelaron diferencias significativas entre las muestras preparadas sobre base seca (liofilizadas) y aquellas tratadas en su forma natural, como se observa en la tabla 2. La humedad en las muestras estudiadas, obtenida por esta vía, osciló entre 45,32% y 53,5%.

### Conclusiones

El principal problema analítico que se presentó en el desarrollo del presente trabajo se relaciona con la interferencia espectral entre el azo compuesto que se produce en la reacción de Shinn y la matriz de la muestra. El uso de la espectroscopia derivativa proporcionó una solución sencilla, directa y elegante a este inconveniente. El pico a 590 nm del espectro  $D^2$  resultó ser una señal analítica clara, limpia y libre de interferencias. Esto

resultó visiblemente ratificado por los estudios de adición de estándar y recuperación.

El montaje utilizado es sencillo y fue ensamblado a partir de accesorios y equipos comerciales disponibles en el mercado. Su mayor mérito es que permite la adquisición de los espectros de un modo simple y rápido, haciendo posible, por esta vía, el desarrollo de estrategias basadas en la espectroscopia derivativa. Por otra parte, las figuras de mérito del método son atractivas y resultan adecuadas para el tipo de análisis propuesto. Los resultados obtenidos indican que el procedimiento AF-EDAM-Vis desarrollado representa una alternativa viable, atractiva y válida para el control del contenido de nitritos en este tipo de productos cárnicos.

### Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT-ULA) por el financiamiento otorgado.

### Referencias bibliográficas

1. MONTES R., LASERNA J.J. *Talanta* 34: 1021-1026, 1987.
2. KADEMZADEH A., ALI A. ENSAFI ALI A. *Anal Chim Acta* 442: 319-326, 2001.
3. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, OFICINA SANITARIA PANAMERICANA. *Criterios de salud ambiental No 5. Nitratos, nitritos y nitrosaminas*. Publicación científica núm. 394, México D.F. (México), 1980.
4. CANTÓN C., BIANCHI PALEARI M.A. *Archivo veterinario Italiano*. Suplemento núm. 2, 1980.
5. *Norma venezolana Covenin*. 2070:2000 y 2126:2000, 2000.
6. NICHOLAS R.A., FOX J.B.Jr. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 56: 922-925, 1973.

7. GALLIGNANI M., VALERO M., SANCHEZ A., BRUNETTO M.R., BURGUERA J.L., BURGUERA M. **Revista de la Sociedad Venezolana de Química** 24: 3-15, 2001.
8. MATTHEW J., MOORCROFT J.D., COMPTON R.G. **Talanta** 54: 785-803, 2002.
9. GALLIGNANI M., VALERO M., BRUNETTO M.R., SÁNCHEZ A., BURGUERA M., BURGUERA J.L., CERDA V. **Ciencia** 11: 235-251, 2003.
10. SÁNCHEZ A. **Evaluación del contenido de nitratos y nitritos en aguas por análisis por inyección en flujo con espectroscopia de absorción molecular en el Uv-visible**. Tesis de Grado de Licenciatura de Química. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida (Venezuela), 1999.
11. SÁNCHEZ ROJAS F., BOSCH OJEDA C., CANO PAVON J.M. **Talanta** 35: 753-761, 1988.
12. THOMAS M. **Ultraviolet and visible spectroscopy**. 2<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Chichester (England), pp. 143-160, 1996.
13. GALLIGNANI M., OVALLES F., BRUNETTO M.R., BURGUERA M., BURGUERA J.L. **Talanta** 68: 365-373, 2005.
14. GALLIGNANI M., VALERO M., CASTELLANOS L., BRUNETTO M.R. "Flow analysis-derivative spectrophotometric determination of nitrite in sausage using the Shinn reaction". In **XIII International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA-2005)**, Book of abstracts. Poster P-11, Las Vegas (USA), 72 pp., 2005.
15. CASTELLANOS LYDA. **Evaluación del contenido de nitritos en productos cárnicos**. Trabajo especial de grado. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (ULA), Mérida (Venezuela), 2006.
16. K. HELRICH (Ed.). **Official methods of analysis of the association of official analytical Chemist**. 15<sup>a</sup> ed. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA (USA), 1990.
17. VAN STADEN J.F., MAKHAFOLA M.A. **Fresenius J. Anal. Chem.** 356: 70-74. 1996.