

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

**SEDE DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES
RECINTO DE GRECIA**

**Desarrollo de un método para el análisis de nitritos en dos
productos cárnicos: el salchichón y el chicharrón de carne de
consumo nacional en la región de Occidente mediante la
técnica de cromatografía de iones**

Tesis de Graduación sometida a la consideración del
Departamento de ciencias naturales de la Sede de Occidente
como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en
Laboratorista Químico

Priscilla Rojas Alvarado

Recinto de Grecia, Costa Rica

2019.

Hoja de Aprobación del Trabajo Final de Graduación

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Ciencias Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Laboratorista Químico.

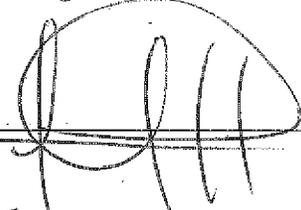
“Desarrollo de un método para el análisis de nitritos en dos productos cárnicos: el salchichón y el chicharrón de carne de consumo nacional en la región de Occidente mediante la técnica de cromatografía de iones”

Aprobado por:

Máster Esteban Pérez López
Presidente del tribunal



M Ing. Laura Adriana Vindas Angulo
Directora de tesis



Dra. Élide Vargas Barrantes
Miembro lector

Élide Vargas B.

MGA. Yorlenny Araya Quesada
Miembro lector

Yorlenny Araya Q

Lic. Marvin Bogantes Jiménez
Miembro del tribunal





Priscilla Rojas Alvarado
Sustentante

CARTA DEL FILÓLOGO

Cartago, 10 de enero de 2020

Los suscritos, Elena Redondo Camacho, mayor, casada, filóloga, cédula de identidad número 3 0447 0799 y Daniel González Monge, mayor, casado, filólogo, cédula de identidad número 1 1345 0416, vecinos de Quebradilla de Cartago, en calidad de filólogos revisamos y corregimos el trabajo final de graduación que se titula: *Desarrollo de un método para el análisis de nitritos en dos productos cárnicos: el salchichón y el chicharrón de carne de consumo nacional en la región de Occidente mediante la técnica de cromatografía de iones*, sustentado por Priscilla Rojas Alvarado.

Hacemos constar que se corrigieron aspectos de forma, redacción, estilo y otros vicios del lenguaje que se pudieron trasladar al texto. La originalidad y la validez del contenido son responsabilidad exclusiva del autor y de sus asesores.

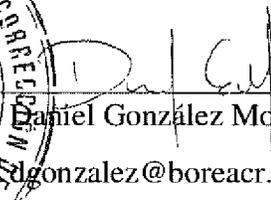
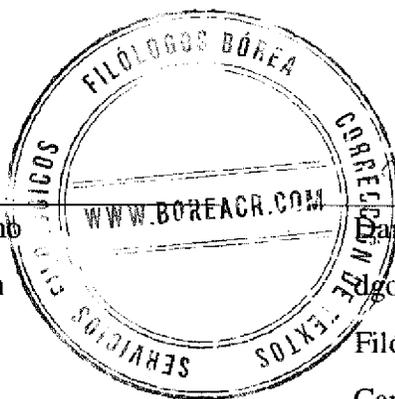
Esperamos que nuestra participación satisfaga los requerimientos de la Universidad de Costa Rica.



Elena Redondo Camacho
eredondo@boreacr.com

Filóloga

Carné Acfil 0247



Daniel González Monge
dgonzalez@boreacr.com

Filólogo

Carné Acfil 0245

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha dado fortaleza en todo momento y me ha guiado para continuar con mis estudios, incluso en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi hermana Emily, por ser el soporte de mi vida, por enseñarme a mantenerme en pie y a luchar en cualquier circunstancia.

A mis padres Rafaela y Rolando, por apoyarme en cada una de las etapas de mis estudios, por ser un gran ejemplo de lucha y por impulsarme a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer a Dios, por permitirme llegar a esta etapa tan importante en mis estudios.

A mis padres, por impulsarme a seguir adelante y, sobre todo, por darme la oportunidad de estudiar.

A la Universidad de Costa Rica y en especial al Recinto de Grecia de la Sede de Occidente, por permitirme llevar a cabo el desarrollo de mi trabajo final de graduación en las instalaciones de la universidad.

A mi directora de tesis, M. Ing. Laura Vindas Angulo, por sus grandes enseñanzas durante la carrera, además, por guiarme y apoyarme durante el desarrollo de la tesis, por su paciencia, sabios consejos y por sus valiosos aportes en mi investigación.

A las lectoras de mi tesis Dra. Élide Vargas Barrantes y M. Yorleny Araya Quesada, por su colaboración, por aportar su conocimiento y apoyarme en este proceso.

A todos los que de una u otra forma colaboraron para que esta tesis fuera posible, mi más sincero agradecimiento y que Dios los bendiga.

“En los momentos de crisis, solo la imaginación es más importante que el conocimiento”.

Albert Einstein

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes	2
1.1.1. Análisis de nitritos en productos cárnicos	3
1.1.2. Análisis de nitritos en productos cárnicos en el ámbito nacional ..	7
1.2. Problema y justificación	9
1.3. Objetivos	11
1.3.1. Objetivo general.....	11
1.3.2. Objetivos específicos.....	12
Capítulo II. Marco teórico	13
2.1. Embutidos	13
2.1.1. El salchichón.....	14
2.1.2. Chicharrón de cerdo	14
2.2. Consumo de embutidos en Costa Rica.....	15
2.3. Conservantes en embutidos	17
2.3.1. Nitritos.....	18
2.4. Efectos en la salud por la adición en embutidos	20
2.4.1. Formación de nitrosaminas.....	20

2.4.2. Cáncer colorrectal.....	22
2.4.3. Incidencia del cáncer colorrectal en Costa Rica	23
2.4.4. Factores que favorecen el cáncer colorrectal	24
2.4.5. Metahemoglobinemia	25
2.4.6. Regulación en el uso de nitritos.....	26
2.4.7. Efectos en el embutido por adición inadecuada de nitrito de sodio	27
2.5. Metodología oficial para la determinación de nitritos en embutidos ...	28
2.5.1. Toxicidad de los reactivos.....	29
2.5.2. Costos de los reactivos.....	30
2.6. Cromatografía de iones	30
2.7. Validación de métodos.....	32
Capítulo III. Metodología	34
3.1. Metodología para el análisis de nitritos en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante la técnica de Cromatografía de Iones	34
3.1.1. Preparación de disoluciones estándar	34
3.1.2. Preparación de la curva de calibración	35
3.1.3. Preparación de la muestra.....	35

3.2. Validación del método cromatográfico para el análisis de nitritos en productos de salchichón y chicharrón de carne	36
3.2.1. Ámbito de trabajo.....	36
3.2.2. Linealidad	36
3.2.3. Precisión	36
3.2.4. Límite de detección.....	37
3.2.5. Límite de cuantificación	37
3.2.6. Veracidad.....	37
3.2.7. Selectividad	38
3.2.8. Robustez.....	38
3.2.9. Incertidumbre.....	39
3.3. Verificación del contenido de nitritos en salchichón y chicharrón de carne.....	39
3.3.1. Metodología y localización de muestreo	39
3.3.2. Tamaño de muestra.....	42
3.4. Comparación de los métodos	42
3.5. Análisis de costos de la metodología por desarrollar.....	43
Capítulo IV. Resultados y discusión.....	44
4.1. Desarrollo de la metodología para el análisis de nitritos en productos	

de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante la técnica de Cromatografía de Iones	44
4.1.1. Determinación de ámbito lineal.....	44
4.1.2. Tratamiento de la muestra.....	46
4.2. Validación del método cromatográfico para el análisis de nitritos en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne.....	49
4.3. Verificación del contenido de nitritos en salchichón criollo y chicharrón de carne	54
4.3.1. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo	55
4.3.2. Contenido de nitrito de sodio en chicharrón de carne.....	68
4.4. Comparación de los métodos	70
4.5. Análisis de costos de la metodología.....	79
Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones	85
5.1. Conclusiones	85
5.2. Recomendaciones	86
Apéndices	88
Apéndice 1	88
Apéndice 2	95
Referencias bibliográficas	99

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química recomendada por el Decreto Ejecutivo n.º 35079, en el que se incluye la Norma Nacional del Sector Cárnico de Costa Rica para los embutidos.....	27
Cuadro 2. Diluciones utilizadas para la preparación de la curva de calibración de nitritos para el desarrollo de la metodología en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante la técnica de cromatografía de iones	35
Cuadro 3. Ejemplo del diseño de las ocho pruebas, según Youden y Steiner para las variables en el método utilizado para el análisis de la robustez	38
Cuadro 4. Código de carnicerías de acuerdo con el cantón de donde proviene la muestra. GR-DMN-#: Grecia, determinación metodología de nitritos; NA-DMN-#: Naranjo, determinación metodología de nitritos; PA-DMN-#: Palmares, determinación metodología de nitritos; SR-DMN-#: San Ramón, determinación de nitritos; SAR-DMN-#: Sarchí, determinación metodología de nitritos.....	41
Cuadro 5. Parámetros de desempeño del método de análisis de nitrito de sodio en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante cromatografía de iones	52
Cuadro 6. Resumen de pruebas realizadas para la comparación de los métodos analíticos en muestras de salchichón criollo	72
Cuadro 7. Análisis de varianza de un factor para la comparación de muestras de salchichón criollo.....	73
Cuadro 8. Resumen de pruebas hechas para la comparación de los métodos	

analíticos en muestras de chicharrón de carne	76
Cuadro 9. Análisis de varianza de un factor para la comparación de muestras de chicharrón de carne	77
Cuadro 10. Análisis de costos, costos requeridos para el análisis de nitrito de sodio mediante cromatografía de iones	80
Cuadro 11. Análisis de costos, costos requeridos para el análisis de nitrito de sodio mediante espectroscopia ultravioleta-visible	81
Cuadro 12. Resultados de la prueba de homocedasticidad	88
Cuadro 13. Resultados de la prueba de robustez del método	89
Cuadro 14. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo en los cantones muestreados	90
Cuadro 15. Resumen de la cantidad de carnicerías que cumplen y no cumplen la normativa, además de las que tienen cantidades menores y mayores a 50.00 ppm	91
Cuadro 16. Contenido de nitrito de sodio en chicharrón de carne en el cantón de Grecia, Sarchí, Naranjo, San Ramón y Palmares	92
Cuadro 17. Prueba F para varianzas de dos muestras de salchichón criollo	92
Cuadro 18. Prueba t para dos muestras de salchichón criollo suponiendo varianzas iguales	93
Cuadro 19. Prueba F para varianzas de dos muestras de chicharrón de carne	93
Cuadro 20. Prueba t para dos muestras de chicharrón de carne, suponiendo	

varianzas desiguales..... 94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de Gries-Romjin, NED: reactivo de NED.....	3
Figura 2. Consumo de embutidos en Costa Rica para un periodo de tres años	16
Figura 3. Reacciones de producción de nitrosaminas.....	21
Figura 4. Configuración del sistema de cromatografía de iones DIONEX ICS 5000: (1) Eluentes; (2) Sistema de bombas; (3) Válvula de inyección; (4) Columna guarda; (5) Columna separadora; (6) Supresor; (7) Detector de conductividad	32
Figura 5. Mapa de los cantones donde se obtuvieron muestras de salchichón criollo y chicharrón de carne, proveniente de supermercados, carnicerías y chicharroneras en este estudio (San Ramón, Palmares, Naranjo, Sarchí y Grecia)	40
Figura 6. Pruebas de curvas de calibración (a), Curva de calibración de alto rango (b). Curva de calibración de bajo rango (c). Curva de calibración de trabajo	46
Figura 7. Cromatograma donde se muestra interferencia del ion cloruro	48
Figura 8. Gráficas para el parámetro de desempeño de linealidad (a), Superposición de curvas de calibración para comprobar linealidad del sistema (b). Análisis de residuales.....	51
Figura 9. Diagrama de causa y efecto de los componentes relacionados en el análisis para la determinación de nitrito de sodio por cromatografía de iones	53
Figura 10. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de	

Grecia	56
Figura 11. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de Sarchí.....	58
Figura 12. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de Naranjo	60
Figura 13. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de San Ramón.....	62
Figura 14. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de Palmares.....	63
Figura 15. Distribución porcentual del cumplimiento del contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en todos los cantones analizados	65
Figura 16. Contenido de nitrito de sodio en chicharrón de carne, en los cantones de Grecia, Sarchí, Naranjo, Palmares y San Ramón.....	70
Figura 17. Valores de concentración (ppm) de la muestra de salchichón criollo (a), Gráfica de valores individuales (b). Gráfica de intervalos.....	74
Figura 18. Gráficas de residuos para ANOVA de un solo factor en muestras de salchichón criollo. (a): Gráfica de probabilidad normal (b) vs. ajustes (c) Histograma (d) vs. Orden.....	75
Figura 19. Valores de concentración (ppm) de la muestra de chicharrón de carne (a), Gráfica de valores individuales (b). Gráfica de intervalos	78
Figura 20. Gráficas de residuos para ANOVA de un solo factor. (a): Gráfica de probabilidad normal (b) vs. ajustes (c) Histograma (d) vs. Orden	79
Figura 21. Comparación de costos de los métodos CI y UV	83

Rojas, P. (2020). Desarrollo de un método para el análisis de nitritos en dos productos cárnicos: el salchichón y el chicharrón de carne de consumo nacional en la región de occidente mediante la técnica de cromatografía de iones. (Tesis de licenciatura). Universidad de Costa Rica.

Directora de Tesis: Máster Laura Vindas ángulo.

RESUMEN

El nitrito de sodio se ha usado como preservante en los embutidos desde el siglo XIX. Desde entonces se evidenció que sus efectos inhibidores contra los microorganismos patógenos eran mejores que otros preservantes. Sin embargo, de acuerdo con diversos estudios, se encontró que cantidades elevadas de nitrito de sodio (mayores a 125 ppm) puede ser peligroso para los consumidores, debido a que se podrían formar nitrosaminas (carcinógenos).

Por este motivo, el análisis para la determinación del contenido de nitrito de sodio en embutidos es sumamente importante. El método oficial es el de la AOAC 973.31 (espectroscopía ultravioleta visible); no obstante, este es un método que se torna complejo con la adición de los reactivos que generan color en las muestras, además de que estos son tóxicos y son un peligro para los analistas.

El método para la determinación de nitritos en dos productos cárnicos, salchichón y chicharrón de carne que se comercializa en carnicerías en la región de Occidente, mediante cromatografía de iones, desarrollado en este trabajo, presentó parámetros de desempeño aceptables para su validación. En el caso de la linealidad se obtuvieron tres curvas de calibración con $R^2 \geq 0.995$ (0.9998, 0.9999 y 0.9998), además, el análisis de residuales y la prueba de homocedasticidad demostró que el método tiene una buena linealidad.

Por otra parte, la precisión del método también fue aceptable, pues se obtuvo un CV: 1.68 % para la repetibilidad y un CV: 1.01 % en cuanto a la reproducibilidad. Con respecto a la veracidad, se obtuvo un sesgo relativo de 4.31 %, por lo tanto, es aceptable (Sesgo relativo < 10 %). En relación con la

selectividad, se confirmó la identidad del analito y se obtuvo un límite de detección de 0.0003 ppm y un límite de cuantificación de 0.001 ppm, por lo que ambos cumplen con el criterio de aceptación.

Con respecto al estudio comparativo entre el método desarrollado en esta investigación y el método oficial realizado, se evidencia que no hay diferencia significativa entre los dos. Esto indica que el método desarrollado aporta resultados igual de fidedignos que el método oficial. Por otra parte, en cuanto al muestreo, en el caso de salchichón criollo se evidenció que un 50.8 % de las muestras analizadas contienen cantidades menores a 50.00 ppm, lo cual es una cantidad insuficiente de nitrito de sodio y esto puede propiciar el crecimiento de microorganismos patógenos.

También se encontró que un 6.8 % de las muestras analizadas no cumplen con la normativa del país. En el caso del chicharrón de carne, se evidenció que hay cantidades de nitrito de sodio cuantificables y detectables en las muestras de chicharrón de carne, lo cual indica que este producto se está adulterando con nitrito de sodio, debido a que no se regula en el país.

Por último, el estudio de costos de reactivos mostró que hay un ahorro del 59.2 %, si se hace una determinación por cromatografía de iones y al considerar diez determinaciones el ahorro es de un 60.1 %. Esto indica que el método desarrollado podría ser una mejor opción en cuanto al gasto de reactivos en una empresa en la que se haga el análisis de nitrito de sodio diariamente.

Palabras clave: nitrito de sodio, chicharrón de carne, salchichón criollo, cromatografía de iones, embutidos.

Capítulo I. Introducción

Los nitritos son aditivos que se usan como preservantes en embutidos desde el siglo XIX. Su uso inició cuando se observó que sales como el nitrato de potasio (KNO_3), el nitrato de sodio (NaNO_3) y el nitrito de sodio (NaNO_2) tenían mejores efectos preservantes que la sal común (NaCl) (Honikel, 2008). Esto se debe a que tienen efectos inhibidores contra microorganismos patógenos, además de que aportan color rojizo al producto (Ruiter y Scherpenisse, 2011).

En los años 30 del siglo XX, en Alemania murieron algunas personas debido a intoxicaciones y la causa se atribuyó a que se añadían cantidades elevadas de nitritos en los productos cárnicos. Por esta razón, en 1934 Alemania implementó la ley de sal de curado de nitrito, la cual establece que solo se permite la adición de nitritos en las premezclas con sal de mesa con un contenido máximo del 0.5 % (Honikel, 2008).

Además de los efectos de intoxicación que causó la adición de cantidades elevadas de nitritos, el descubrimiento de la formación de nitrosaminas; considerados como carcinogénicos (Selbes, 2014), hizo necesaria la restricción en el uso de este preservante en concentraciones adecuadas. Lo anterior llevó a regular la adición del nitrito de sodio usado como preservante, en distintos países, lo cual se mantiene a la fecha. Generalmente, la cantidad permitida de nitritos se encuentra en el ámbito de 120-150 mg/kg (Rath y Reyes, 2015).

En la actualidad, según el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos de América (2016), el contenido de nitrito de sodio en embutidos no debe exceder 200 mg/kg (FDA, 2017). En Costa Rica se permite una concentración máxima de 125 mg/kg (Decreto Ejecutivo n.º 35079-MEIC-

MAG-S, publicado en La Gaceta n.º 45 del 5 de marzo del 2009).

Debido al impacto en la salud que ha tenido la adición de nitritos en los embutidos, es necesario determinar su contenido en estos. Esta razón justifica el desarrollo de una gran variedad de técnicas analíticas. El método oficial para la cuantificación de nitritos en embutidos es el de la AOAC 973.31; que es una técnica de espectroscopía ultravioleta visible, el cual se torna complejo por la adición de los reactivos que generan color en las muestras (Rodríguez, Vargas y Gómez, 2009).

Por lo anterior, en la actualidad, existen diferentes métodos para la determinación de nitritos en embutidos, como polarografía, voltimetría, amperimetría, electroforesis de zona capilar o sensores de membrana (Aydin, 2013). No obstante, el objetivo de esta investigación es desarrollar un método para la determinación de nitritos en dos productos cárnicos, salchichón y chicharrón de carne que se comercializa en carnicerías en la región de Occidente, mediante cromatografía de iones.

1.1. Antecedentes

A causa de la regulación que debe hacerse del contenido de nitritos en los productos cárnicos, se han elaborado distintos métodos de análisis para determinar la concentración de este aditivo en carnes y sus derivados. Entre estos se pueden citar los métodos instrumentales directos como cromatografía, polarografía, voltimetría, amperimetría, electroforesis de zona capilar o sensores de membrana (Aydin, 2013).

El método seleccionado dependerá de la matriz con la que se trabaja. Para la mayoría de productos alimenticios que contienen nitritos, se usa el método espectrofotométrico, el cual se basa en la capacidad de convertir aminas aromáticas en iones diazonio, los cuales se acoplan a otro compuesto

aromático y forman un colorante azoico. La formación de este colorante se conoce como la reacción de Griess-Romjin y se describe en la Figura 1 (Ruiter y Bergwerff, 2005; Ruiter y Scherpenisse, 2011; Aydin, 2013).

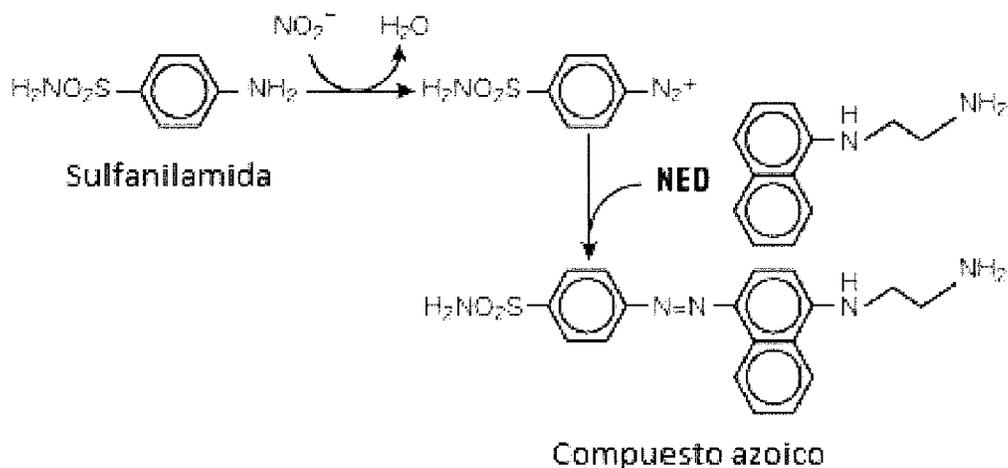


Figura 1. Reacción de Gries-Romjin, NED: reactivo de NED

Fuente: Promega, 2009.

1.1.1. Análisis de nitritos en productos cárnicos

Para el caso de embutidos, el método oficial para cuantificar nitrito de sodio de la AOAC 973.31 (AOAC, 2016), establece el uso de la espectroscopia ultravioleta-visible. De acuerdo con Harris (2001), esta técnica se ve afectada por un error instrumental asociado con la posición de las cubetas. A pesar de que el analista cuente con el cuidado de colocar la cubeta en la misma posición, se obtiene un error considerablemente mayor que el obtenido por el efecto del ruido eléctrico.

Esto se debe a que factores como los pequeños desplazamientos en la cubeta dentro del portacubetas pueden inducir a que se obtengan variaciones de absorbancia (Harris, 2007). Otra desventaja es que se trata de un procedimiento complejo, debido a que se debe medir sin demora, ya que se

da una rápida descomposición del color en las muestras una vez que se adicionan los reactivos generadores de color (sulfanilamida y el reactivo de NED) (Rodríguez *et al.*, 2009; Sheng, Fu, Yuan e Ing, 2013).

En 1997 se publicó un estudio para evaluar los niveles de nitrito residual en productos canadienses de carne curada, como salchichas, salami y tocineta, entre otros (Sen y Baddoo, 1997). En este se utilizó la técnica de colorimetría por medio de la reacción de Griess. El muestreo se llevó a cabo en diferentes periodos a lo largo de varios años (1972, 1983-1985, 1993-1995, 1996) y se encontró que los niveles medios totales de nitritos residuales disminuyeron ligeramente en un ámbito de 20-25 años.

Por ejemplo, en el periodo de 1983-1985, 70 de 659 muestras presentaron cantidades de nitritos residuales mayores a 100 ppm, mientras que entre los años 1993-1995, solamente dos de 76 muestras excedieron 100 ppm. Los autores concluyen que las diferencias se deben a que la industria ha ejercido un mejor control sobre la cantidad de nitritos agregados a la carne curada.

Siu y Henshall (1998), llevaron a cabo un análisis de nitratos y nitritos en muestras comerciales de jamón y salami en Estados Unidos, mediante cromatografía de iones con detección de absorbancia por el método ultravioleta visible. En el estudio se llevó a cabo un análisis de recuperación en el que se obtuvo un porcentaje de recuperación de nitratos y nitritos mayor al 90 %. Para el desarrollo de la extracción de la muestra, los autores eliminaron la mayor parte de los componentes de la matriz que causa interferencias, como proteínas y sustancias grasas. Lamentablemente, este método no se comparó con el método oficial AOAC 973.31 para la verificación de la trazabilidad en los resultados.

En el 2016, en Irán se llevó a cabo un análisis de nitritos mediante el

método espectrofotométrico que involucra la reacción de Griess (Bahadoran, Mirmirana, Jeddib, Azizic, Ghasemib y Hadaeghd, 2016). El propósito del estudio fue crear una base de datos acerca del contenido de nitritos y nitratos presentes en alimentos como vegetales, frutas, granos, legumbres, productos lácteos, carnes y carnes procesadas consumidos por la población iraní. En el caso de las muestras de carnes procesadas, el contenido de nitritos se encontró en un rango de 33.9 - 139 ppm, mientras que en estudios anteriores estos valores correspondían a 0.2 - 195 ppm (Alonso *et al.*, 1996; Bianchi *et al.*, 1995; Schuster y Lee, 1987 citados por Bahadoran, Mirmirana, Jeddib, Azizic, Ghasemib y Hadaeghd, 2016).

Los autores mencionan que hubo algunas limitaciones en el estudio, asociadas a la falta de materiales de control y por los efectos de confusión causadas por interferencias en las matrices alimenticias en el desarrollo del color durante la reacción de Griess (Bahadoran *et al.*, 2016). Las interferencias se dieron en diferentes matrices, entre las cuales están la vitamina C, los flavonoides, el magnesio, el hierro, el calcio, el sulfato y el cloruro. Por otra parte, se llevó a cabo una comparación de los resultados obtenidos por colorimetría con el método de HPLC y el efecto de confusión de las matrices de alimentos fue menor. Estos resultados demuestran que las técnicas de cromatografía presentan menos problemas de interferencias debido a la matriz analizada.

En dos regiones de Italia (Apulia y Basilicata), entre enero de 2007 y diciembre de 2011, varios autores investigaron los niveles endógenos de nitritos y nitratos en alimentos (Iammarino Di Taranto y Cristino, 2013). Las 1785 muestras que se analizaron en el estudio correspondían a 200 muestras de carnes frescas (carne de res, carne de cerdo, carne de caballo y carne de pollo), 1195 productos cárnicos, 180 productos lácteos (queso mozzarella, quesos de corta y larga maduración), 120 mariscos (mejillones y almejas) y 90

hortalizas que corresponden a espinacas y lechugas (frescas y congeladas).

El análisis se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de iones validada con detección de conductividad. En las muestras de carnes frescas los resultados mostraron la ausencia de nitrito residual. En cuanto a las muestras correspondientes a productos cárnicos, los residuos de nitrato se confirmaron en 66 muestras en concentraciones menores a 40 ppm (Iammarino *et al.*, 2013). Sin embargo, se confirmó una adición no permitida con altas cantidades de nitritos en tres muestras de carne picada cuyos valores fueron de 2396.9, 3116.8 y 2218.0 ppm. Los autores confirmaron la necesidad de desarrollar controles e introducir nuevos límites legales, sobre todo, en el caso de la carne procesada debido al elevado contenido de nitritos.

Por otra parte, López, Viera y Urbano (2016) desarrollaron y validaron una metodología por cromatografía de iones para la determinación de nitritos, nitratos y cloruros en carne. El estudio se llevó a cabo en España y se analizaron muestras de carne fresca (res, cerdo y pollo), a las cuales se le adicionaron preservantes, entre estos el nitrito de sodio para conservar sus propiedades y evitar la proliferación de bacterias.

Los resultados demostraron que el método tiene buena linealidad y los valores obtenidos (expresado el R^2 en porcentaje), para cada analito fueron de 98.4 % para cloruros, 99.5 % para nitratos y 98.9 % para nitritos. Por otra parte, no existe un efecto significativo de la matriz que pueda afectar los resultados cuando los estándares de calibración se preparan en agua ultrapura y se sigue el procedimiento de extracción descrito en el estudio (López *et al.*, 2016).

Otra investigación desarrollada por el Departamento de Evaluación y Desarrollo de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) de Argentina, determinó la cantidad de nitritos y nitratos en productos cárnicos mediante la técnica de HPLC de par iónico, la cual se validó

como parte de la investigación. El estudio permitió encontrar ambos analitos en un rango de concentraciones óptimo para el control de los parámetros que establece la legislación de ese país; a saber, entre 6.1 y 36.8 $\mu\text{g/mL}$ para el ion nitrato y entre 3.3 y 20 $\mu\text{g/mL}$ para el ion nitrito. Los niveles de incertidumbre se encontraron en el orden del 17 % para ambos analitos. La legislación de Argentina establece un valor máximo permitido de 150 mg/kg para nitrito de sodio y de 300 mg/kg para nitrato de sodio (Flores, Zalazar, Ayala, Hernáez, Figueroa y Bello, 2016).

1.1.2. Análisis de nitritos en productos cárnicos en el ámbito nacional

Entre los primeros estudios hechos en Costa Rica relacionados con el análisis de embutidos, se encuentra un artículo de 1958, en el que se desarrolló una investigación sobre la epidemiología de la Salmonelosis, en carnes procesadas costarricenses. En este estudio se reportaron los primeros datos sobre la contaminación por bacterias en carnes procesadas en San José. De 250 muestras analizadas, un 8 % dio resultados positivos, es decir, que contaban con presencia de *Salmonella*. Por lo tanto, se evidencia que existía contaminación por bacterias en estos alimentos (De la Cruz, 1958).

Es importante destacar que para 1958 no había regulación en el país en cuanto al uso de nitritos. Por ende, es probable que no se usaran las sales nitrificantes en cantidades adecuadas para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Otra opción es que los productores no conocieran sobre el uso de preservantes en las carnes procesadas en el caso de las muestras que reportaron resultados positivos de contaminación.

En 1996 se llevó a cabo un estudio del contenido de nitrito y bases volátiles nitrogenadas en el salchichón producido por embutidoras nacionales

(Vargas, 1996). Para esto, se hizo un muestreo de salchichón en 13 de las empresas embutidoras más importantes del Sector Metropolitano y se utilizó el método oficial de la AOAC (973.31) para el análisis de nitritos (Vargas, 1996; Vargas y Herrera, 2002). El estudio determinó que un 50 % de las empresas embutidoras incumplieron la norma vigente al sobrepasar el contenido de nitritos, la cual estipula que el valor máximo permitido es de 125 mg/kg. El valor más alto obtenido en el estudio fue de 161 mg/kg y el más bajo fue de 77 mg/kg.

En un estudio reciente de Vindas, Rodríguez y Araya (2017), se analizaron 30 lotes distintos de salchichas de una única marca entre los meses de octubre de 2015 a febrero de 2016, mediante la metodología oficial de la AOAC (973.31) para el análisis de nitritos. Los muestreos se hicieron, de forma aleatoria, en supermercados en el cantón de San Ramón. Entre los resultados obtenidos se evidencia que el contenido de nitritos no sobrepasó el límite máximo permitido en Costa Rica (125 ppm), ya que el valor máximo obtenido correspondió a 121 ± 2 ppm y el mínimo fue de 38 ± 2 ppm.

Como dato importante, se obtuvo un lote que no pudo cuantificarse, debido a que la absorbancia obtenida fue mayor que la de los patrones de la curva de calibración, por lo que se asume que este lote sobrepasaba el límite de aceptación del contenido de nitritos. Sin embargo, no se puede confirmar la cantidad exacta de nitritos en esta muestra.

Vindas *et al.* (2017), mencionan que, aunque las muestras cuantificadas cumplen con lo estipulado en la reglamentación costarricense, su comportamiento es fluctuante en cuanto a las concentraciones de nitritos obtenidas en los lotes analizados. Esto evidencia que existen variaciones importantes, al considerar que las muestras provienen de un mismo producto y de una misma marca, por lo que recomiendan estudiar los factores que

influyen para su debido control.

Por otra parte, en cuanto a los estudios hechos en el país relacionados con nitritos, se tiene un estudio interesante en productos cárnicos procesados. En este se evaluó la sustitución del nitrito de sodio, el eritorbato de sodio y el lactato de sodio por un producto comercial a base de extractos naturales, en cuanto a las características físico químicas, microbiológicas y sensoriales de chorizo cocido (Soto, 2016).

El extracto natural utilizado fue el Natpre T-10 plus, que es un conservante natural elaborado a partir de extractos de frutas y especias mediterráneas comestibles que tienen capacidades antimicrobianas y antioxidantes. Se demostró que el extracto natural presentó actividad antimicrobiana contra bacterias ácido lácticas (en concentración de 1 %), con la misma eficacia que la mezcla de aditivos comunes (Soto, 2016). Aunque el almacenamiento de chorizo cocido se llevó a cabo por tan solo 27 días, los resultados no permiten asegurar que el Natpre T-10 plus presenta la misma eficacia de inhibición de los microorganismos patógenos en todos los productos cárnicos existentes.

De acuerdo con los estudios mencionados, se demuestra que existen estudios de determinación de nitritos por medio de cromatografía de iones, que fueron exitosos. En estos análisis se obtuvo resultados con buena exactitud y precisión. Por lo tanto, esta técnica cromatográfica es una alternativa atractiva para la determinación de nitritos en los productos de interés del presente estudio.

1.2. Problema y justificación

Los nitritos son preservantes efectivos que inhiben la proliferación de bacterias como *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* (Ruiter y

Scherpenisse, 2011; lammarino *et al.*, 2013). Estas pueden causar botulismo alimentario y vómitos, náuseas, dolor abdominal, malestar general, debilidad, postración, calambres y diarrea moderada (López *et al.*, 2008). De acuerdo con Mital (2012), los nitritos también aportan características deseables como color, sabor, textura y propiedades que gustan a los consumidores.

A pesar de las ventajas demostradas de este preservante, se conoce que se genera una reacción entre los nitritos y las aminas, la cual produce nitrosaminas, que son compuestos carcinogénicos (Selbes, 2014; Rath y Reyes, 2015). Además, las nitrosaminas hacen que se produzca una oxidación de la hemoglobina que inhibe el transporte de oxígeno en la sangre, lo que resulta en metahemoglobina (lammarino *et al.*, 2013).

El método oficial para la determinación de nitritos en los productos cárnicos es el de la AOAC 973.31, el cual requiere del uso de espectroscopia ultravioleta visible y, como se mencionó, esta técnica presenta interferencias por la matriz (Ferreira y Silva, 2008). Asimismo, se debe considerar que en el análisis de nitritos por espectroscopia ultravioleta visible se utilizan reactivos como la sulfanilamida y N- (1 - naftil) etilendiamina (Reactivo de NED). Estos son reactivos que poseen un alto nivel de toxicidad (Morales y Bosch, 2007; Merck, 2014).

A partir de los resultados expuestos en los párrafos anteriores, el uso de la cromatografía es potencialmente atractivo, debido a que es una técnica más rápida, con mayor sensibilidad y cuenta con mejor selectividad que los métodos basados en la colorimetría (Ferreira y Silva, 2008). Además, es una técnica novedosa, que de forma reciente se empezó a utilizar para la determinación de nitritos en alimentos (Siu y Henshall, 1998, Chang, *et al.*, 2013, lammarino, *et al.*, 2013, López, *et al.*, 2016).

Asimismo, es importante indicar que mediante el método oficial de la

AOAC 973.31, se usan reactivos para la generación de un colorante azoico, como la sulfanilamida y el reactivo de NED, los cuales tienen efectos tóxicos (Weir, 2009; Jarrell, 2012, Merck, 2014). En el caso de la sulfanilamida, puede incluir cristalización en los riñones (Weir, 2009; Jarrell, 2012), en cuanto al reactivo de NED, se ha demostrado que el contacto con nitritos y otros compuestos similares puede causar la liberación de nitrosaminas (Merck, 2014). También se ha demostrado que este compuesto causa cáncer en mamíferos (Rath y Reyes, 2015).

Al agregar estos reactivos a una muestra de embutido, se expone la salud del analista en alta medida, mientras que, por medio de la técnica de cromatografía de iones, no es necesario el uso estos reactivos. Por lo tanto, esta técnica es beneficiosa para la salud de los analistas. Por último, es importante indicar que el desarrollo de la presente investigación, se basa en una adaptación del estudio de López, *et al.* (2016). Además, esta técnica no se ha empleado para el análisis de nitritos en productos cárnicos en Costa Rica como el salchichón y el chicharrón de carne, aspecto que motiva el estudio.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Desarrollar un método para el análisis de nitritos en dos productos cárnicos, el salchichón y el chicharrón de carne de consumo nacional en la región de Occidente, mediante la técnica de cromatografía de iones.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Elaborar una metodología para el análisis de nitritos en dos productos, el salchichón y el chicharrón de carne, mediante la técnica de cromatografía de iones.
2. Validar el método cromatográfico de análisis de nitritos en productos de salchichón y chicharrón mediante la Guía de Validación de Métodos del Ente Costarricense de Acreditación (ECA).
3. Verificar el contenido de nitritos en salchichón y chicharrón de carne, por cromatografía de iones en muestras obtenidas de carnicerías que se ubican en la zona de Occidente.
4. Comparar estadísticamente el método cromatográfico con el método oficial para la determinación de nitritos en productos cárnicos, establecido por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC).
5. Determinar, mediante un análisis de costos de reactivos consumibles, si la implementación de la metodología a desarrollar es más factible que la metodología oficial en un laboratorio de análisis de alimentos.

Capítulo II. Marco teórico

2.1. Embutidos

Según el Decreto Ejecutivo n.º 35079 (2009), los embutidos son productos que se preparan a partir de carne picada y condimentada con diferentes especias. Esta se introduce en una funda, en la que se embuten los productos cárnicos procesados, o bien se utiliza la piel de tripas (diversos segmentos de intestino grueso, medio o delgado y otras membranas) de cerdo. El Decreto también establece que:

En Costa Rica existen distintos productos cárnicos, tales como: la salchicha, el salchichón, la mortadela, el salami y el chorizo. Las materias primas cárnicas deben provenir de animales de abasto sanos, sacrificados en mataderos autorizados y con inspección del médico veterinario oficial. Los productos deben ser elaborados con grasa comestible de origen animal o vegetal y no se le deben ser agregados cartílagos, intestinos y cualquier otro tejido no permitido por la autoridad competente (Decreto Ejecutivo n.º 35079, 2009).

En la actualidad, para la elaboración de embutidos se utilizan máquinas como moledoras, cortadoras, embutidoras, hornos y empacadoras. Además, se agregan aditivos como nitrito de sodio, nitrato de sodio, ácido ascórbico, el isoascórbico y el eritorbato de sodio para la preservación de la vida útil de estos (Lizardi, Portugal, Ramírez, Coy y Verdugo, 2009).

En la elaboración del embutido, primero se acondiciona la materia prima y se limpia. Posteriormente, se muele por separado la carne y la grasa, después se hace la emulsificación, en la que se agregan los aditivos a la mezcla. A continuación, se embute la pasta en la tripa de celulosa. Después, se hace el secado, el ahumado y la cocción. Por último, el embutido se deja enfriar y se almacena (Bedolla *et al.*, 2003).

2.1.1. El salchichón

El salchichón es un producto cocido, elaborado a base de carne fresca o congelada, con agregado de carne cocida, con adición de grasa comestible, perfectamente trituradas y mezcladas, emulsionado. Hecho con ingredientes de uso permitido e introducido en fundas autorizadas con un perímetro de 113 mm como mínimo y máximo de 160 mm, además, puede ser ahumado (Decreto Ejecutivo n.º 35079, 2009).

La composición del salchichón consiste en carne de res, grasa, agua, sal, nitritos y nitratos, condimentos, sustancias de relleno y sustancias ligantes (Levin, 1990). El tipo de salchichón que se estudiará, es al que se le conoce como criollo, el cual es proveniente de carnicerías en las que lo elaboran, o bien comercializan de pequeñas y microembutidoras. Este tipo de salchichón puede contener carne de res, cerdo o pollo o ser una combinación de los tipos mencionados.

2.1.2. Chicharrón de cerdo

El chicharrón de cerdo se hace friendo la piel de cerdo con la grasa de este (Castro, Alcántara, Colón y Clavé, 1996). En Costa Rica, es un producto que se elabora en pequeña escala, normalmente en carnicerías o en los hogares para el autoconsumo. El chicharrón de cerdo que se analizará en esta investigación; el cual es de la carne del cerdo, no de la piel, se le hace un proceso de cocimiento y se plantea la hipótesis que, además, pasa por un proceso de curado. Esto se debe al color rojizo que presenta; que no es característico de este, por lo que se sospecha que se le agrega nitrito de sodio. Cabe destacar que este producto no se encuentra normado por el Decreto Ejecutivo n.º 35079 (2009), debido a que no corresponde a un embutido, por lo tanto, no debería contener nitritos como preservantes.

2.2. Consumo de embutidos en Costa Rica

Según Levin (1990), entre un 50 - 60 % de 3000 toneladas de productos cárnicos que eran consumidos anualmente en los hogares costarricenses, correspondían a la producción de salchichón. En relación con a un estudio de mercadeo alimentario del Centro de Investigación y Tecnología de Alimentos (CITA), se obtuvo que un 78.3 % de los hogares costarricenses consumen embutidos, lo cual indica que estos corresponden al tercer tipo de carne preferida en el país. Además, se obtuvo que un 21.8 % las familias costarricenses consumen en promedio 20 kg de embutidos per cápita al año (CITA, 1993; citado por Vargas, 1996).

De acuerdo con un análisis sobre el consumo de productos cárnicos elaborado por el CITA (1993), en el que se recopilan datos de los años 1997, 1999 y 2001, el consumo per cápita por año de embutidos corresponde a 6.327 kg, 8.030 kg y 8.049 kg. Esto significa que entre 1997 a 1999, hubo un incremento en el consumo, sin embargo, de 1999 a 2001, el valor aumentó en pequeña medida (citado por Serrano, 2003). Lo anterior representa que el consumo de embutidos aumenta cada año.

Por otra parte, se observa en la Figura 2 el porcentaje de consumo de los diferentes tipos de embutidos. Se denota que el consumo de salchichón es el de mayor porcentaje en comparación con los otros embutidos, estos son de 29 %, 32 % y 31 % para los años 1997, 1999 y 2001 respectivamente (CITA, 1993) (citado por Serrano, 2003). Por lo tanto, se determina que este es el embutido de preferencia por los costarricenses.

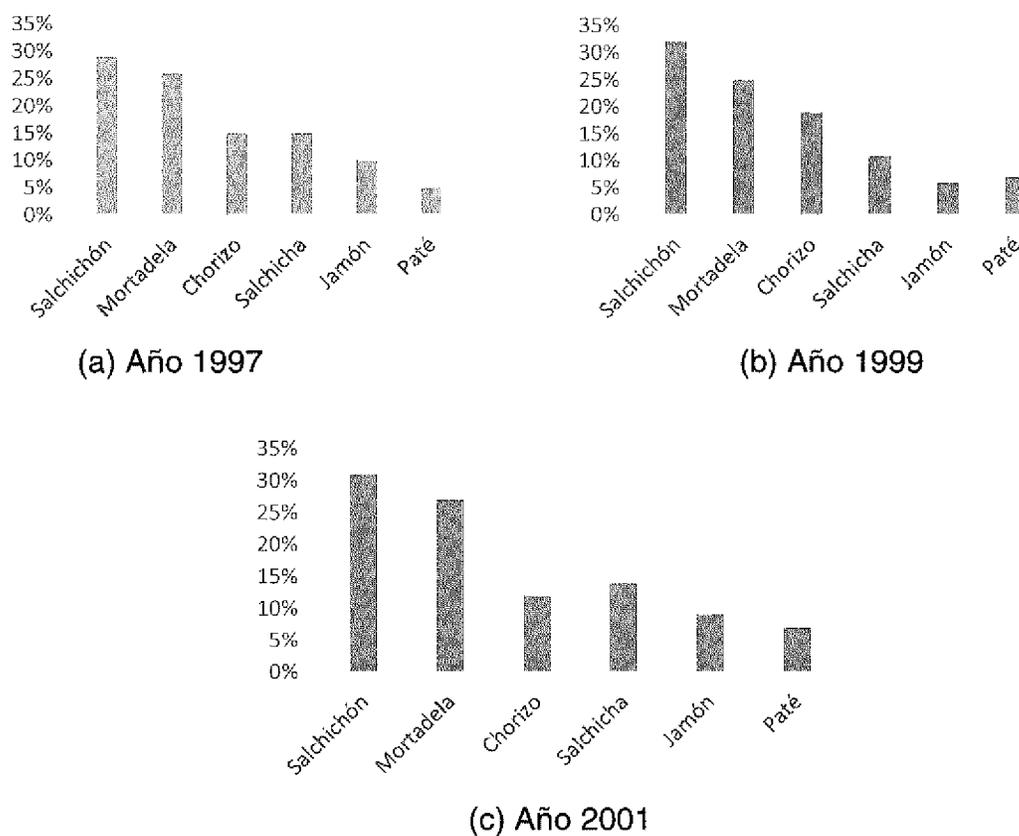


Figura 2. Consumo de embutidos en Costa Rica para un periodo de tres años

Fuente: elaboración propia, a partir de Serrano, 2003.

Posteriormente, el Ministerio de Salud llevó a cabo una encuesta nacional de nutrición en el periodo del 2008 - 2009, sobre el consumo per cápita de embutidos en el ámbito nacional. En esta obtuvo que, de un 75 % de la muestra encuestada ($n=1383$), un 28.6 % consumía embutidos. Además, se denotó que el salchichón es el embutido más consumido en el país con un porcentaje de 11.9 (Ministerio de Salud, 2013).

Por otra parte, en el 2014 se llevó a cabo un estudio de mercado en dos áreas geográficas de Costa Rica, San Carlos y la Gran Área Metropolitana (GAM), con el fin de comparar los hábitos de consumo de embutidos. En esta

investigación se encontró que un aproximado del 80 % de la población total encuestada consume embutidos, independientemente de que residan en la GAM o en San Carlos. En relación con los tipos de embutidos, se obtuvo que los encuestados consumen en mayor medida el salchichón (Araya, Jiménez, Ivankovich y García, 2014).

De acuerdo con datos de la consultora Euromonitor, en el 2014 se vendieron 30.6 toneladas de carne procesada, en el 2015 las ventas fueron de 31.2 toneladas y en el 2016 de 31.8 toneladas. Las ventas se encuentran relacionadas directamente con el consumo de los embutidos y esto demuestra un aumento en el consumo de la carne procesada en el país (Euromonitor International, 2016).

2.3. Preservantes en embutidos

Desde la prehistoria, el hombre ha ideado maneras de preservar los alimentos, con el fin de aumentar su vida útil. Entre los métodos más antiguos que se han utilizado se encuentran el secado, la congelación, el enfriamiento y la adición de sal (Ruitter y Scherpenisse, 2011). Las antiguas civilizaciones empleaban métodos para la preservación de la vida útil de las carnes como el ahumado y, posterior a esto, añadían sal, lo cual implica una transformación de la carne, es decir, que se hace un curado (Torres, 2008).

La elaboración de embutidos, la desarrollaron inicialmente los primeros cazadores como una actividad esencial para el aumento de la vida útil de los alimentos (Sullivan, 2011). Además, se conoce que desde la antigüedad, en países como China, Grecia, Egipto y también el Imperio romano, se elaboraban estos productos para las campañas militares. Los embutidos representaban una forma de conservar el alimento, con ayuda del sazonado y sacando provecho del frío estacional (Torres, 2008).

Cuando inició la elaboración de embutidos, se utilizaba la sal común (NaCl) para el sazonado y preservación de los productos cárnicos, además de otros preservantes, los cuales eran muy distintos a los que se utilizan en la actualidad. Estos llegaron a causar efectos secundarios no deseados a los consumidores, debido a que afectaban la salud de las personas, por ejemplo, el uso de sales de metales pesados o formaldehído como conservantes hizo que se dieran intoxicaciones agudas. Debido a esto, fue necesario la restricción del uso de conservantes de alimentos a componentes que sean seguros en las concentraciones necesarias para que su función sea adecuada (Ruiter y Scherpenisse, 2011).

La sal común (NaCl o KCl) se sigue utilizando para la elaboración de los embutidos en Costa Rica, según el Decreto Ejecutivo n.º 35079-MEIC-MAG-S, publicado en La Gaceta n.º 45 del 5 de marzo del 2009. Además, de acuerdo con este decreto, se permite el uso de los siguientes preservantes: diacetato de sodio, nitrato de sodio, nitrato de potasio, nitrito de sodio, nitrito de potasio y sorbato de potasio. Según Sánchez y Pineda (2003) se utilizan fosfatos como el tripolifosfato de sodio, el hexametafosfato de sodio, el pirofosfato ácido de sodio, el pirofosfato de sodio y el fosfato de disódico. Estos se emplean para disminuir la contracción de los productos durante el ahumado y aumentar la capacidad de retención de agua del embutido.

2.3.1. Nitritos

El nitrito es un componente químico que se encuentra en el ambiente y es parte del ciclo del nitrógeno, es un nutriente excretado por el fitoplancton y se forma, de manera endógena, en los seres humanos (Aydin, 2013; Ruiz, Herrero y Jiménez, 2016). Se utiliza como aditivo para la preservación de productos cárnicos desde el siglo XIX, cuando las personas se dieron cuenta de que sales como el nitrato de potasio (KNO_3), el nitrato de sodio ($NaNO_3$) y

el nitrito de sodio (NaNO_2) tenían mejores efectos preservantes que la sal común (NaCl) (Honikel, 2008).

Los nitritos se encargan de estabilizar el color rojo de los pigmentos naturales de la carne, retrasan la rancidez, contribuyen con el desarrollo del sabor e inhiben la descomposición anaeróbica y la proliferación de microorganismos patógenos (Rodríguez *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2016). Estos han sido los aditivos más usados en los productos cárnicos para aumentar su vida útil, debido a su aporte en las características como color, sabor y textura (Mital, 2012). Además, ayudan a retrasar la descomposición de los productos cárnicos, esto se debe a que inhiben la descomposición anaeróbica, la proliferación de microorganismos patógenos y retrasan el desarrollo de la rancidez (Rodríguez *et al.*, 2009). Según Shafiur (2007) se utilizan concentraciones mayores a 100 mg/kg para la protección contra los microorganismos patógenos.

Los nitritos inhiben la proliferación de bacterias como *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* (Ruitter y Scherpenisse, 2011; Iammarino *et al.*, 2013), también inhibe la bacteria *Salmonella* (Quintero y López-Munguía, 1993) y la bacteria *Listeria monocytogenes* (Hospital, Temprano, Hierro, Fernández y García, 2018).

La bacteria *Clostridium botulinum* puede causar botulismo alimentario, lo cual puede evolucionar desde formas leves de diarrea, hasta un cuadro grave de parálisis simétrica de pares craneales. Esto seguido por una parálisis flácida descendente y simétrica, que puede afectar a la musculatura respiratoria y provocar la muerte de la persona por insuficiencia respiratoria (Argelich, Nogué, Soler y Serra, 2014). La bacteria *Staphylococcus aureus* puede causar vómitos, náuseas, dolor abdominal, malestar general, debilidad, postración, calambres y diarrea moderada (López *et al.*, 2008).

Por otra parte, la *Salmonella* puede causar gastroenteritis e intoxicaciones alimentarias (Quintero y López-Munguía, 1993), mientras que la *Listeria monocytogenes* puede causar listeriosis, esta es una infección que ocurre cuando se ingieren alimentos con esta bacteria. En los adultos, la enfermedad puede tomar muchas formas, según cuál órgano o sistema de órganos esté infectado (infección del corazón, infección del cerebro o del líquido cefalorraquídeo, neumonía, infección de la sangre o gastroenteritis). Además, en las mujeres embarazadas puede ocasionar un aborto espontáneo (Ryser y Marth, 2007).

Según Woods *et al.* (citados por Shafiur, 2007; Ruiz, *et al.*, 2016) se ha demostrado que la adición de nitritos también retrasa el crecimiento de varias especies en otros géneros de bacterias como *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* en los productos cárnicos.

2.4. Efectos en la salud por la adición en embutidos

A pesar de los efectos inhibidores de microorganismos patógenos que se atribuyen a los nitritos, se ha presentado una gran discusión con respecto a su uso. Esto se debe a que se demostró que el uso de este aditivo forma compuestos de alta peligrosidad para la salud de las personas, como la formación de nitrosaminas y la incidencia de metahemoglobinemia (Ruíz *et al.*, 2016).

2.4.1. Formación de nitrosaminas

En el caso de las nitrosaminas, estas se forman mediante una reacción entre los nitritos y las aminas secundarias en medio ácido (Figura 3) (Vargas, 1996). La formación de nitrosaminas en los productos cárnicos es un proceso

complejo; debido a que existe una gran variedad de factores que influyen en la formación de este compuesto. Desde el método de cocción, la temperatura utilizada, el almacenamiento y presencia de microorganismos y la cantidad residual de nitrito (Rath y Reyes, 2015). La reacción entre las aminas secundarias que se encuentran en los productos cárnicos con la cantidad residual de nitrito, es la que produce las nitrosaminas, que son compuestos que causan efectos carcinógenos (Selbes, 2014; Rath y Reyes, 2015).

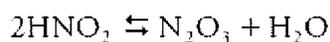
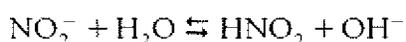


Figura 3. Reacciones de producción de nitrosaminas

Fuente: Rath y Reyes, 2015.

Diversos estudios han confirmado que los tejidos animales, que son similares a los humanos, son susceptibles a las propiedades carcinógenas de las nitrosaminas (Rodríguez *et al.*, 2009; Mital, 2012; Rath y Reyes, 2015). En otro estudio de Corpet (2011), se determinó que la reacción entre la carne curada y el nitrito, produce de manera endógena, nitroso-compuestos, los cuales favorecen el cáncer. Debido a esto, por ejemplo, en las heces de ratones con una dieta a base de carne curada contenían de 5 a 20 veces más compuestos de N-nitroso que las heces de los roedores de control, los cuales se alimentaban con una dieta basada en caseína.

Según Rath y Reyes (2015), investigaciones durante 1957 a 1962 mostraron que el pescado estaba contaminado con nitrosaminas, lo cual generó la idea de que las nitrosaminas también podían encontrarse en los alimentos humanos. Esto marcó el comienzo de una investigación mundial

sobre la presencia de nitrosaminas en distintas matrices, incluyendo alimentos. Desde entonces, se han encontrado nitrosaminas en una gran variedad de productos como los alimentos, en particular, los productos cárnicos curados (Rath y Reyes, 2015).

En la década de los 70 se dieron informes de niveles altos de nitrosaminas en ciertos tipos de mezclas de carne curada que contenían nitritos. Esto lo que indica es que algunas de las nitrosaminas pueden originarse a partir de estas mezclas, las cuales se forman aparentemente en condiciones secas, debido a la interacción de aminas en especias y nitritos (Sen, Donaldson, Charbonneau y Miles, 1974). La concentración de las nitrosaminas depende de la concentración de nitritos (Mital, 2012).

La producción de una alta concentración de nitrosaminas es muy peligrosa, ya que este compuesto causa efectos carcinógenos en mamíferos. Según, Tricker y Preussmann (1991), se demostró que aproximadamente más de 300 compuestos N-nitroso son carcinógenos en una o más especies animales, también se concluyó que más de 40 especies animales, incluyendo monos, son susceptibles a la carcinogénesis inducida por las nitrosaminas. Además, se desarrollaron estudios *in vitro* y se concluyó que los tejidos experimentales de los animales son similares a los de los humanos, por lo tanto, se asume que los tejidos humanos son susceptibles a los efectos de las nitrosaminas (Vargas y Herrera, 2002; Rath y Reyes, 2015).

2.4.2. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CRC, por sus siglas en inglés), es una de las causas importantes de muerte en diversos países como Estados Unidos y países de Europa (Santarelli, Pierre y Corpet, 2008). En un informe hecho en noviembre de 2007, se evidenció que las carnes rojas y las carnes procesadas

causan cáncer colorrectal. Existen diversas hipótesis que explican la razón por la cual las carnes procesadas producen cáncer colorrectal. Algunas se basan en que contienen gran cantidad de grasas, así como aditivos específicos (en particular sal y nitrito de sodio) y en que el almacenamiento a largo plazo produce productos de oxidación del colesterol (Santarelli *et al.*, 2008).

No obstante, la explicación principal se basa en que la reacción entre la carne curada y el nitrito produce, de manera endógena, compuestos nitrosos, los cuales favorecen el cáncer. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), el nitrito que se ingiere en condiciones que favorecen la nitración endógena es probablemente carcinogénico para los seres humanos. Es decir, que se encuentra en el Grupo 2 A de la lista de elementos cancerígenos, según la OMS (IARC, 2007, 94 citado por Santarelli *et al.*, 2008).

En octubre de 2015, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC); que es un órgano de la Organización Mundial de la Salud (OMS) especializado en el cáncer, evaluó la carcinogenicidad del consumo de carne roja y de carne procesada (embutidos). En estos estudios, se clasificó los embutidos como agentes carcinógenos para los humanos (Grupo 1), con base en evidencia suficiente en humanos de que el consumo de carne procesada causa cáncer colorrectal. De acuerdo con la OMS, las estimaciones más recientes del Proyecto sobre la Carga Global de Enfermedad, cerca de 34 000 muertes por cáncer al año en todo el mundo son atribuibles a dietas ricas en carne procesada.

2.4.3. Incidencia del cáncer colorrectal en Costa Rica

Según el Registro Nacional de Tumores, desde 1990 hasta el 2005, los tipos de cáncer con mayor incidencia en Costa Rica han sido próstata, piel,

estómago, pulmón y colon en el caso de los hombres y piel, mama, estómago, cérvix y colon para las mujeres (Barrantes, 2009). Según este autor, el cáncer en Costa Rica es un problema de salud pública, su aparición se encuentra relacionada con ciertas prácticas de vida poco saludables como el tabaquismo, alcoholismo, ciertos tipos de dieta, sedentarismo y la obesidad.

De acuerdo con datos de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) del 2014, se egresaron al hospital 128 441 pacientes por tumores. De estos, 1031 fueron debido al cáncer colorrectal. En una investigación comparativa sobre la incidencia del cáncer colorrectal en países centroamericanos y suramericanos hecha en el 2016, se determinó que Costa Rica se encuentra entre los cuatro países con mayor incidencia del cáncer colorrectal (Sierra y Forman, 2016). Entre los resultados, se obtuvo que en el país la incidencia de cáncer colorrectal en hombres aumentó en un 3.1 % y en mujeres un 1.9 %. Además, se presentó un aumento mayor en la mortalidad en los hombres costarricenses y en hombres y mujeres brasileños, con un aumento promedio de alrededor del 2 % por año.

2.4.4. Factores que favorecen el cáncer colorrectal

Según Young (2013), se ha postulado la dieta como uno de los factores principales en el origen del cáncer colorrectal. Además, existen otros elementos que favorecen el desarrollo del cáncer colorrectal, entre los que se encuentra la obesidad, el consumo de alcohol, el fumado, dietas altas en carnes rojas y carnes procesadas y un bajo consumo de vegetales y frutas (Sierra y Forman, 2016). Estos autores mencionan que Costa Rica, Ecuador y Guatemala tienen la prevalencia de fumado más baja entre los países estudiados. Además, Costa Rica, Colombia, Bolivia y Perú, tienen el consumo per cápita más bajo de alcohol.

De acuerdo con Sierra y Forman (2016), se puede inferir que los factores que favorecen en mayor proporción al cáncer colorrectal en Costa Rica son la obesidad, las dietas altas en carnes rojas y carnes procesadas y el bajo consumo de vegetales y frutas. Además, como se mencionó, en Costa Rica se ha presentado un importante aumento en la ingesta de embutidos (Ministerio de Salud, 2001; Euromonitor International, 2016).

2.4.5. Metahemoglobinemia

El uso de nitritos como aditivo en los embutidos puede resultar en metahemoglobinemia. Las nitrosaminas hacen que se produzca una oxidación con la hemoglobina que inhibe el transporte de oxígeno en la sangre. El nitrito cambia la estructura de la hemoglobina porque contiene hierro en la forma oxidada (Fe^{2+}) y la transforma en metahemoglobina, que contiene hierro férrico (Fe^{3+}) (Basulto, Manera y Baladía, 2013; Ruíz *et al.*, 2016). La metahemoglobinemia puede causar cianosis e hipoxia tisular, además de que puede llegar a la muerte (Lepe, Aguilar y Godínez, 2015).

Debido a la poca capacidad de transportar y liberar el oxígeno en los tejidos, puede causar cianosis (en concentraciones de metahemoglobina de 15 %) e hipoxia tisular (en concentraciones de metahemoglobina de 60 %) y si estas aumentan se puede llegar a la muerte (Miale, 1985; Basulto *et al.*, 2013; Lepe *et al.*, 2015). Existen dos tipos de metahemoglobinemia: la hereditaria y la adquirida, en la segunda la causa más frecuente es el efecto tóxico de sustancias como colorantes de anilina, sulfamidas, nitratos y nitritos (Miale, 1985). Este mismo autor menciona que en 1967 se encontró una metahemoglobinemia debido a consumo de salchichas polacas.

En una noticia del Diario Médico (2012), se menciona que un gran consumo de carnes curadas incrementa los reingresos hospitalarios, debido a

que los síntomas, en las personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aumentan. Esto de acuerdo con un estudio hecho por el Centro de Investigación en Epidemiología Ambiental en Barcelona. Los investigadores llevaron a cabo un seguimiento a 274 pacientes durante dos años desde su primer ingreso. La explicación de la causa podría estar en los nitritos que se añaden a las carnes curadas como conservantes y agentes antibacterianos, los cuales producen especies reactivas de nitrógeno que dañan los tejidos de los pulmones.

2.4.6. Regulación en el uso de nitritos

Debido a los efectos perjudiciales en la salud que causan los nitritos, se planteó su eliminación como aditivo en los productos cárnicos, no obstante, si se elimina el nitrito de sodio se aumentaría el riesgo de intoxicación por bacterias. Esto se debe que, actualmente, el nitrito es un ingrediente esencial para proporcionar carnes curadas de alta calidad y libres de bacterias. Por esta razón, se decidió limitar la cantidad de nitrito de sodio agregado a los productos cárnicos a 120 ppm, el cual fue el nivel más bajo en el que sus efectos inhibidores seguían siendo eficaces. Además, una cantidad mayor a esta no puede metabolizarla el organismo, lo cual genera problemas en la salud (Sullivan, 2011; Mital, 2012).

En la actualidad, en el ámbito mundial la cantidad permitida de nitritos se encuentra entre 120 - 150 mg/kg, este valor es similar en muchos países. De acuerdo con el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos de América (2016), se instaure que el contenido de nitrito de sodio en embutidos no debe exceder de 200 mg/kg (FDA, 2017).

En Costa Rica hasta el año 1989 se permitían valores de hasta 140 mg/kg, ese mismo año se reguló la cantidad de nitrito de sodio mediante un

decreto y se redujo a 125 mg/kg (Vargas, 1996). En el decreto actual el límite máximo permitido corresponde a 125 mg/kg. Una cantidad mayor a la mencionada no es metabolizada por el organismo y puede generar problemas de salud como los mencionados (Decreto Ejecutivo n.º 35079-MEIC-MAG-S, publicado en La Gaceta n.º 45 del 5 de marzo del 2009). En el Cuadro 1 se muestra la composición química recomendada, según el Estado, para Costa Rica:

Cuadro 1. Composición química recomendada por el Decreto Ejecutivo n.º 35079, en el que se incluye la Norma Nacional del Sector Cárnico de Costa Rica para los embutidos

Parámetro	Valor permitido
Cenizas	≤ 3,5 % (m/m)
Grasa	≤ 25,0 % (m/m)
Proteína Total	≥ 11,0 % (m/m)
Carbohidratos	≤ 10,0 % (m/m)
Humedad	≤ 75,0 % (m/m)
Nitrito y Nitrato de Sodio (máximo)	≤ 125 mg/kg

Fuente: Decreto Ejecutivo n.º 35079-MEIC-MAG-S, publicado en La Gaceta n.º 45 del 5 de marzo del 2009.

2.4.7. Efectos en el embutido por adición inadecuada de nitrito de sodio

Como se mencionó con anterioridad, existen regulaciones mundiales en cuanto a la adición de nitrito de sodio en los embutidos, sin embargo, en los reglamentos no se establece una cantidad mínima de nitrito de sodio que se deba cumplir. Por ejemplo, en el Decreto Ejecutivo n.º 35079 (2009), no se indica una cantidad mínima de nitrito de sodio, solamente se menciona el

máximo permitido.

No obstante, de acuerdo con Shafiur (2007) y Palaveciano y Palacio (2017), la cantidad idónea para que el nitrito de sodio funcione de manera adecuada y pueda inhibir los microorganismos patógenos con eficacia, es que esta sea mayor a 50.00 ppm. De lo contrario, el embutido no estaría protegido de forma adecuada, por lo que podría contaminarse con microorganismos patógenos y, por ende, perjudicar la salud de los consumidores.

2.5. Metodología oficial para la determinación de nitritos en embutidos

Para la determinación de nitritos en embutidos se utiliza el método espectrofotométrico (AOAC 973.31), el cual se basa en la capacidad de convertir aminas aromáticas en iones diazonio. Estos se acoplan a otro compuesto aromático y forman un colorante azoico (Ruiter y Scherpenisse, 2011; Aydin, 2013). La formación de este colorante se conoce como la reacción de Gries-Romjin (Figura 1) y se basa en la reacción química entre la sulfanilamida y el dihidrocloruro de N-1-naftil-etilendiamina (Reactivo de NED) en condiciones ácidas. Al interactuar con el NO_2^- , forma el compuesto azoico (coloreado).

Una de las desventajas que existe con el método oficial es la degradación que se da en el color después de pasado cierto tiempo de haber agregado los reactivos sulfanilamida y reactivo de NED. Esto es una desventaja en plantas de producción de embutidos, ya que el método de análisis causa una demora considerable. Además, cabe resaltar que se han obtenido resultados positivos en diversos estudios que utilizan metodologías distintas a la oficial, como el uso de la cromatografía de iones (López *et al.*, 2016) y la cromatografía líquida de alta resolución (Flores *et al.*, 2016). Esto demuestra que el método oficial no es el único que puede aportar resultados

fidedignos.

2.5.1. Toxicidad de los reactivos

La metodología oficial, además de aportar una demora en el análisis, la sulfanilamida y el reactivo de NED se ha demostrado que tienen efectos tóxicos. En 1937 se dieron más de 100 muertes por el consumo de un antibiótico llamado *elixir de la sulfanilamida*. Se plantea que esta situación se dio debido al reactivo dietilenglicol, el cual se utilizaba como disolvente de la sulfanilamida insoluble, ya que este es altamente tóxico y que la sulfanilamida también tiene efectos tóxicos, los cuales pueden incluir cristalización en los riñones. La combinación de estos dos reactivos generaba un efecto tóxico en la salud de las personas, lo que generó una gran cantidad de muertes (Morales y Bosch 2007; Weir, 2009; Jarrell, 2012).

Sobre los datos toxicológicos de la sulfanilamida, se conoce que para la dosis de mutación en pruebas con ratas, una concentración de 30 $\mu\text{mol/L}$ de sulfanilamida provoca daños en el hígado de las ratas. Esto implica que es posible que tenga el mismo efecto en los humanos (World Headquarters Hach Company, 2009; Alfa Aesar, 2015)

En el caso del reactivo de NED, se menciona que el contacto con nitritos y otros compuestos similares pueden causar la liberación de nitrosaminas (Merck, 2014). Al agregar este reactivo a la muestra de embutido, se expone la salud del analista en alta medida. No existen indicaciones de que este reactivo tenga efecto cancerígeno, no obstante, como se da una liberación de nitrosaminas podría causar efectos carcinogénicos a los analistas que tengan alta exposición ocupacional a este tipo de reactivos. Esto por ser parte de su rutina laboral, ya que se ha demostrado que este compuesto causa cáncer en mamíferos (Rath y Reyes, 2015).

Es importante destacar que la metodología que se empleará en el presente estudio no necesita de la adición de la sulfanilamida ni del reactivo de NED. Esto se debe a que en la técnica de cromatografía de iones no es necesario generar color en las muestras.

2.5.2. Costos de los reactivos

Además de la toxicidad de los reactivos, es importante llevar a cabo un análisis de costos de los mismos. Esto porque un tema relevante en el día a día en un laboratorio, ya que determina que método es más viable económicamente para un laboratorio. Por cromatografía de iones se utilizan dos reactivos para la elaboración de fase móvil, carbonato de sodio (Na_2CO_3) y bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Mientras que para el método de espectroscopia ultravioleta-visible, se emplean los reactivos sulfanilamida, reactivo de NED y ácido acético.

2.6. Cromatografía de iones

La metodología propuesta en este estudio es la cromatografía de iones. La cromatografía se basa en una múltiple transferencia de materia entre dos fases, una estacionaria y una móvil, en la cual se lleva a cabo una separación. Esta se produce debido a la distinta velocidad con la que los componentes de la mezcla se desplazan, a través de la fase estacionaria cuando son arrastrados por la fase móvil (Mauri, Llobat y Herráez, 2010).

En cuanto a la cromatografía de iones, también llamada cromatografía de intercambio iónico, es una variante de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se trata de un método eficaz para la separación y determinación de iones, con base en el uso de resinas de intercambio iónico (Pérez, 2014). Asimismo, en el uso de un material cambiador de iones como

fase estacionaria, la cual se emplea en la separación de sustancias iónicas, tanto orgánicas como inorgánicas, de acuerdo en las propiedades de carga eléctrica de las sustancias (Gismera, Quintana y Silva de Campos, 2009).

En la Figura 4 se muestra la configuración del equipo usado en este estudio. En esta se observan todos los componentes involucrados en el sistema, el cual funciona de la siguiente manera: en (1) se tiene el eluyente, o bien fase móvil, en el caso del análisis de aniones, se utiliza comúnmente carbonato de sodio-bicarbonato de sodio. El eluyente pasa por el sistema de bombas (2), el cual se encarga de bombear la fase móvil por todo el sistema.

En la válvula de inyección (3), la muestra se mezcla con la fase móvil y es transportada hacia la columna guarda (4), en donde la misma funciona como una especie de filtro, para proteger a la columna separadora (5). En cuanto la muestra pasa por la columna separadora, los iones presentan una separación debido a las diferentes retenciones al interactuar con la fase fija de las columnas analíticas (Gismera *et al.*, 2009; Pérez, 2014).

A continuación, la muestra se encuentra separada y pasa por el supresor (6) antes de ingresar al detector (7), esto porque el cromatógrafo de iones que se utilizó en este estudio cuenta con un detector de conductividad suprimida. Este tipo de detector es el que se usa con mayor frecuencia, debido a que ofrece un mejor rendimiento comparado con los otros detectores existentes (Haddad, 2004).

El detector funciona de la siguiente manera, cuando los iones del analito se separan en la columna de intercambio iónico, en conjunto con la fase móvil se dirigen al supresor, en donde la conductividad de la fase móvil se reduce, o bien se suprime. De esta manera, la conductividad de los analitos eluidos aumenta, lo cual lleva a un gran aumento en la señal del analito (Haddad, 2004).

La cromatografía iónica ha logrado tener importancia debido a que puede identificar y cuantificar aniones y cationes en bajas concentraciones, es decir, que es una técnica que cuenta con buena sensibilidad y sin emplear reactivos peligrosos (Trujillo, Fonseca, García y Martínez, 2009). Se usa en diferentes áreas de la investigación como en análisis del medioambiente, análisis clínico y análisis industriales (Haddad, 2004).

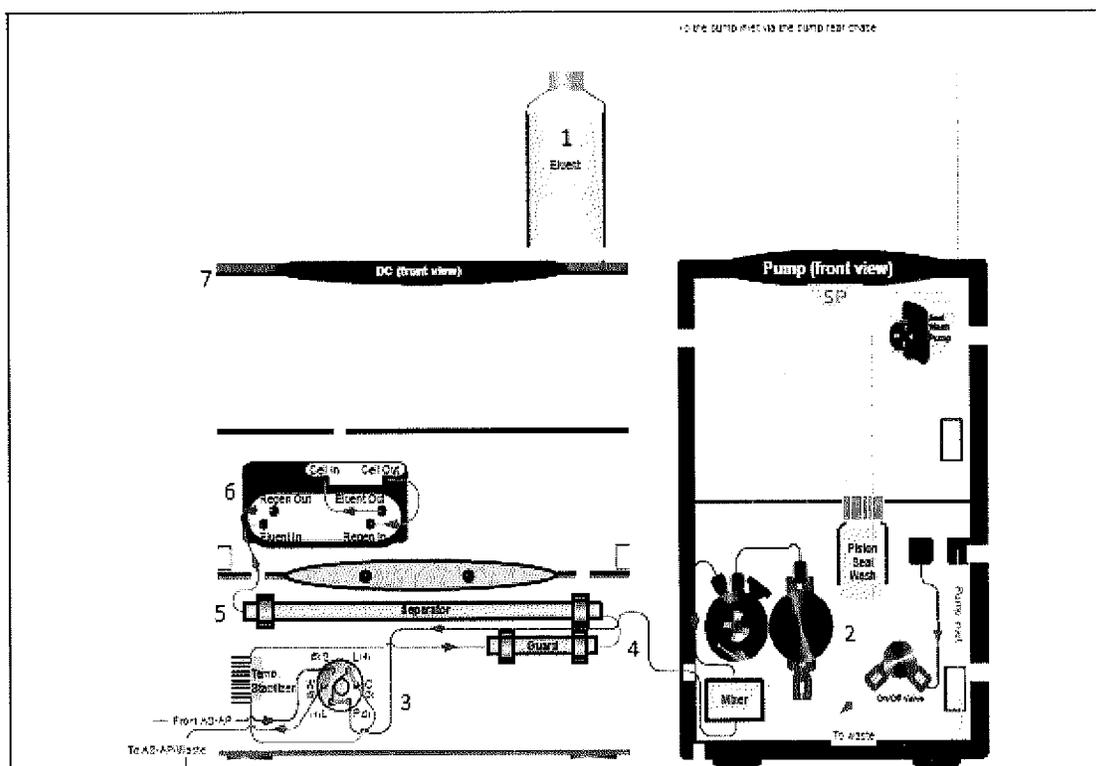


Figura 4. Configuración del sistema de cromatografía de iones DIONEX ICS 5000: (1) Eluentes; (2) Sistema de bombas; (3) Válvula de inyección; (4) Columna guardiana; (5) Columna separadora; (6) Supresor; (7) Detector de conductividad

Fuente: Thermo Scientific, 2013.

2.7. Validación de métodos

Cuando se desarrollan nuevos métodos deben validarse. Esto ya que

se debe asegurar que se obtienen resultados fidedignos por el nuevo método empleado. Además, se debe demostrar que este aporta resultados igual de confiables que los obtenidos por la metodología oficial.

De acuerdo con el Ente Costarricense de Acreditación (ECA), el proceso de validación de un método consiste en cuatro pasos, en el primero, se deben determinar los parámetros de desempeño. A continuación, se deben establecer los criterios de aceptación para la evaluación de los parámetros de desempeño. Como tercer paso, se deben evaluar los resultados obtenidos en la validación, comparando los parámetros de desempeño con los criterios de aceptación. Por último, se debe declarar la conformidad del método (ECA, 2014).

Para determinar los parámetros de desempeño que se evalúan, se clasifica el método de acuerdo con las situaciones que describe el ECA en la guía para la validación de métodos (ECA, 2014). En este se indica que hay tres situaciones en las cuales se valida un método, la Situación 1, se trata de un método normalizado, la Situación 2, se trata de un método normalizado modificado y la Situación 3, es un método no normalizado o desarrollado por el Laboratorio. En el caso de este estudio se tiene la Situación 3, por lo tanto, los parámetros de desempeño se eligieron según lo que indica el ECA.

Capítulo III. Metodología

3.1. Metodología para el análisis de nitritos en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante la técnica de Cromatografía de Iones

Se utilizó como referencia el procedimiento de las autoras López, Viera y Urbano (2016); sin embargo, se hicieron distintas modificaciones, entre las cuales se encuentra, el tipo de matriz en estudio. López *et al.* (2016), analizaron carnes frescas curadas de pollo, res y cerdo, mientras que en el presente estudio se analizó salchichón criollo y chicharrón de carne. Además, en este trabajo se analizó el nitrito de sodio presente en las matrices mencionadas y el rango de concentración (ppm) fue distinto que el método de López *et al.* (2016). Los cambios hechos se mencionan detalladamente, a continuación:

3.1.1. Preparación de disoluciones estándar

Se tomó como referencia la preparación de las disoluciones estándar indicadas en el método oficial (AOAC 973.31, 2016).

3.1.1.1. Disolución madre (500 ppm)

Se pesó 0.025 g de NaNO_2 y se aforó a 50.00 ml con agua desionizada.

3.1.1.2. Disolución de trabajo (50 ppm)

Se tomó una alícuota de 10.00 ml de la disolución madre y se aforó a un volumen de 100.00 ml con agua desionizada.

3.1.2. Preparación de la curva de calibración

Se prepararon siete soluciones patrón, a partir de la disolución de trabajo (Cuadro 2), se aforan los balones con agua desionizada.

Cuadro 2. Diluciones utilizadas para la preparación de la curva de calibración de nitritos para el desarrollo de la metodología en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante la técnica de cromatografía de iones

Patrón	Alícuota (mL)	Balón (mL)	Concentración (ppm)
1	0.50		1.00
2	1.00		2.00
3	1.50		3.00
4	2.00		4.00
5	2.50	25.00	5.00
6	3.00		6.00
7	3.50		7.00

Fuente: elaboración propia.

3.1.3. Preparación de la muestra

Se analizaron muestras de salchichón criollo y chicharrón de carne provenientes de carnicerías en las que se elaboren o comercialicen este tipo de productos. Las muestras se guardaron en refrigeración y con aislamiento de luz para evitar su descomposición. Se tomó como referencia la preparación de la muestra que se indica en el método de la AOAC 973.31 (2016), sin embargo, se hicieron dos cambios importantes para este estudio. Primero, se pesaron 50.00 g de muestra y esta se centrifugó durante 20 minutos, después de aforar el balón. Además, se omitió la adición de los reactivos sulfanilamida y el reactivo de NED, debido a que en el método desarrollado no se tenía que generar color.

3.2. Validación del método cromatográfico para el análisis de nitritos en productos de salchichón y chicharrón de carne

La validación del método se llevó a cabo según los lineamientos establecidos en ECA-MC-PO01 (2014) y ECA-MC-PO01-G01 (2014). Debido a que se trata de un método no normalizado, se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño:

3.2.1. Ámbito de trabajo

Se hicieron mediciones de dos curvas de calibración, de siete patrones cada curva. La primera se llevó a cabo con bajas concentraciones (4.00 - 9.00 ppm) y la otra con altas concentraciones (13.00 - 18.00 ppm).

3.2.2. Linealidad

Se hicieron tres curvas de calibración independientes para medir la linealidad del método. Se llevó a cabo un análisis de regresión en las tres curvas de calibración, además analizaron los residuales y se hizo una prueba de homocedasticidad para asegurar que los datos se comportan de manera lineal.

3.2.3. Precisión

La precisión mide cuán cerca están los resultados entre sí (Eurolab España, 2016) y en este trabajo se verificó utilizando los siguientes dos parámetros:

3.2.3.1. Repetibilidad

Se seleccionaron dos patrones de la curva de calibración, 3.00 ppm y 5.00 ppm. Se prepararon 10 repeticiones de cada patrón y se determinó la desviación estándar.

3.2.3.2. Precisión intermedia

Se seleccionaron dos patrones de la curva de calibración, 3.00 ppm y 5.00 ppm. Se prepararon 10 repeticiones de cada patrón, una cada día diferente y se determinó la desviación estándar.

3.2.4. Límite de detección

Se hicieron medidas replicadas de blancos de reactivos fortificados a bajas concentraciones del analito. Se hicieron 10 medidas replicadas a concentraciones de 0.3 ppm, 0.5 ppm y 0.9 ppm. Se calculó la desviación estándar y el límite de detección (LOD).

3.2.5. Límite de cuantificación

Se hicieron medidas replicadas de blancos de reactivos fortificados a bajas concentraciones del analito. Se hicieron 10 medidas replicadas a concentraciones de 0.3 ppm, 0.5 ppm y 0.9 ppm. Se calculó la desviación estándar y el límite de cuantificación (LOQ).

3.2.6. Veracidad

Se midió el material de referencia (MR) utilizando el método candidato (Eurolab España, 2016). Se comparó el valor promedio obtenido, con el valor de referencia x_{ref} para el MR. A continuación, se calculó el sesgo, $b = \bar{x} - x_{ref}$;

el sesgo relativo en porcentaje, $b \% = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} 100$ y la recuperación relativa en porcentaje (recuperación aparente) $b \% = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$.

3.2.7. Selectividad

Inicialmente, se observó el cromatograma para verificar que la señal observada corresponde al ion nitrito. Después, se analizaron diez muestras de ensayo por el método candidato y el método oficial. Con los resultados, se hizo un análisis de varianza de un factor (ANOVA), para determinar si el método no presenta diferencias significativas en comparación con el método oficial.

3.2.8. Robustez

Se llevó a cabo el *test* de robustez de Youden y Steiner, en el cual se permite evaluar siete variables con el análisis de ocho muestras (Cuadro 3), las variables se eligen estratégicamente. Es decir, se eligen los factores más críticos del método y cada uno se estudia mediante un valor alto (A, B, C... F) y un valor bajo (a, b, c ... f) (FAO, 2005). Los resultados se presentan con letras desde s hasta z, a partir de estos resultados se puede calcular el efecto de cada una de las variables, esto calculando la media de la variable alta y la variable baja y por medio de una resta se obtiene la diferencia.

Cuadro 3. Ejemplo del diseño de las ocho pruebas, según Youden y Steiner para las variables en el método utilizado para el análisis de la robustez

Valor de la condición de la variable	Análisis							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	A
B,b	B	B	B	B	b	b	b	b
C,c	C	C	C	C	c	c	c	c

Valor de la condición de la variable	Análisis							
	1	2	3	4	5	6	7	8
D,d	D	D	D	D	d	d	d	d
E,e	E	E	E	E	e	e	e	e
E,f	F	F	F	F	f	f	f	f
Resultado de mediciones	s	t	u	V	w	x	y	z

Fuente: FAO, 2005.

Los factores por estudiar no deben ser necesariamente siete, se puede considerar un número menor de variables, siempre y cuando se lleven a cabo las ocho pruebas, para que no se afecte el balance del diseño. En el caso de esta prueba, se hizo el estudio de seis variables, temperatura de digestión, tiempo de digestión, flujo de fase móvil, tiempo de centrifugado, medición de degradación de la muestra y temperatura del detector.

3.2.9. Incertidumbre

Se analizaron los componentes relacionados en el análisis, por ejemplo, la medición de masa, el uso de balones y pipetas. A continuación, se calcula la incertidumbre de todos los componentes relacionados con el análisis. Los resultados se pueden ver en el Apéndice 2.

3.3. Verificación del contenido de nitritos en salchichón y chicharrón de carne

3.3.1. Metodología y localización de muestreo

La toma de muestras se hizo mediante la metodología de muestreo a juicio, en la que se emplea el conocimiento y la opinión personal del

investigador para identificar los elementos de la población que deben incluirse en la muestra (Levin y Rubin, 2004). Esta es la metodología que emplean los entes nacionales encargados de la regulación de los productos embutidos en Costa Rica, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) y el Ministerio de Salud. Esta última es la institución que se encarga de dar la orden de llevar a cabo los análisis (Vindas, Rodríguez y Araya, 2019).

El muestreo de los productos cárnicos de consumo nacional de salchichón y chicharrón, se llevó a cabo en carnicerías, supermercados y chicharroneras de cinco cantones de la zona de Occidente, Palmares, San Ramón, Naranjo, Sarchí y Grecia. Esto se muestra en la Figura 5.

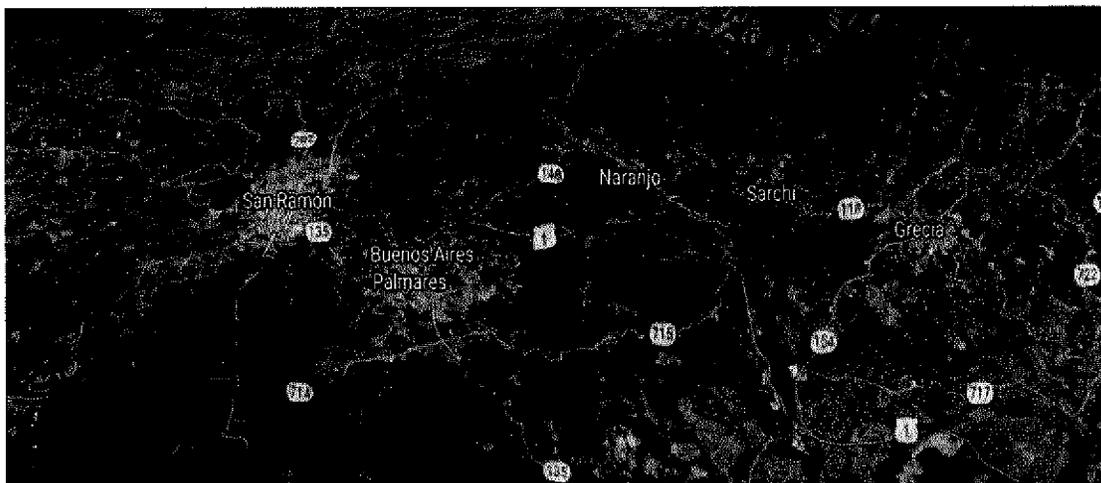


Figura 5. Mapa de los cantones donde se obtuvieron muestras de salchichón criollo y chicharrón de carne, proveniente de supermercados, carnicerías y chicharroneras en este estudio (San Ramón, Palmares, Naranjo, Sarchí y Grecia)

Fuente: Google Maps, 2019.

En el Cuadro 4, se especifican los códigos correspondientes a cada carnicería en los cantones en los que se tomaron muestras. Estas carnicerías fueron seleccionadas debido a que producían o comercializaban salchichón criollo o chicharrón de carne en algunos casos.

Cuadro 4. Código de carnicerías de acuerdo con el cantón de donde proviene la muestra. GR-DMN-#: Grecia, determinación metodología de nitritos; NA-DMN-#: Naranjo, determinación metodología de nitritos; PA-DMN-#: Palmares, determinación metodología de nitritos; SR-DMN-#: San Ramón, determinación de nitritos; SAR-DMN-#: Sarchí, determinación metodología de nitritos

Cantones	Grecia	Sarchí	Naranjo	San Ramón	Palmares
Código de	GR-DMN-01	SAR-DMN-01	NA-DMN-01	SR-DMN-01	PA-DMN-01
carnicerías	GR-DMN-02	SAR-DMN-02	NA-DMN-02	SR-DMN-02	PA-DMN-02
	GR-DMN-03	SAR-DMN-03	NA-DMN-03	SR-DMN-03	PA-DMN-03
	GR-DMN-04	SAR-DMN-04	NA-DMN-04	SR-DMN-04	PA-DMN-04
	GR-DMN-05	SAR-DMN-05	NA-DMN-05	SR-DMN-05	PA-DMN-05
	GR-DMN-06	SAR-DMN-06	NA-DMN-06	SR-DMN-06	PA-DMN-06
	GR-DMN-07	SAR-DMN-07	NA-DMN-07	SR-DMN-07	PA-DMN-07
	GR-DMN-08	SAR-DMN-08	NA-DMN-08	SR-DMN-08	PA-DMN-08
	GR-DMN-09	SAR-DMN-09	NA-DMN-09	SR-DMN-09	
	GR-DMN-10	SAR-DMN-10	NA-DMN-10	SR-DMN-10	
	GR-DMN-11		NA-DMN-11	SR-DMN-11	
	GR-DMN-12			SR-DMN-12	
	GR-DMN-13				
	GR-DMN-14				
	GR-DMN-15				
	GR-DMN-16				
	GR-DMN-17				
	GR-DMN-18				
	GR-DMN-19				
	GR-DMN-20				
	GR-DMN-21				
	GR-DMN-22				

Fuente: elaboración propia.

3.3.2. Tamaño de muestra

Se llevó a cabo un estudio poblacional, en el que se viajó a los cinco cantones y se preguntó en cada carnicería, supermercado y chicharronera, si producían o comercializaban salchichón criollo o chicharrón de carne. Esto con el fin de determinar cuáles carnicerías, supermercados y chicharroneras, de los distritos centrales de los cantones del estudio; elaboraban o comercializan los productos de interés.

De acuerdo con el estudio poblacional, se determinó que existen 63 carnicerías en total (22 en Grecia, 11 en Naranjo, 8 en Palmares, 12 en San Ramón y 10 en Sarchí), esto para el periodo de abril 2019 - junio 2019. Del total de 63 carnicerías, 61 elaboran o comercializan salchichón criollo y únicamente 15 carnicerías chicharrón de carne.

Según Vivanco (2005), existe una relación directa entre el tamaño de la muestra y los procedimientos de análisis. En cuanto a los procedimientos de análisis univariados, los cuales se utilizan para estudiar el comportamiento de las variables de forma individual, no presentan exigencias respecto al número de muestras necesarias para su implementación. En este trabajo se analizaron todas las muestras obtenidas del estudio poblacional, con el fin de garantizar un tamaño adecuado para analizarse estadísticamente (Vivanco, 2005). Además, cada muestra se analizó por duplicado.

3.4. Comparación de los métodos

Para la comparación de resultados entre el método oficial y el de cromatografía de iones, se llevó a cabo el análisis de diez réplicas de una misma muestra, mediante las dos metodologías mencionadas. Con los resultados obtenidos, se hicieron diferentes pruebas estadísticas de

significancia, se hizo uso de pruebas estadísticas para el análisis de errores sistemáticos como prueba F, comparación de dos medias experimentales y el análisis de varianza (ANOVA). Las pruebas se hicieron con ayuda de programas estadísticos como MINITAB 18 y Microsoft Excel Plus 2016.

3.5. Análisis de costos de la metodología por desarrollar

Se determinaron los costos de los reactivos consumibles que se utilizan mediante el método espectrofotométrico de la AOAC y los usados a través de cromatografía de iones, para su comparación. Se hicieron las debidas cotizaciones a empresas del país para conocer los precios de los reactivos en las dos metodologías y se procesaron los datos para su comparación.

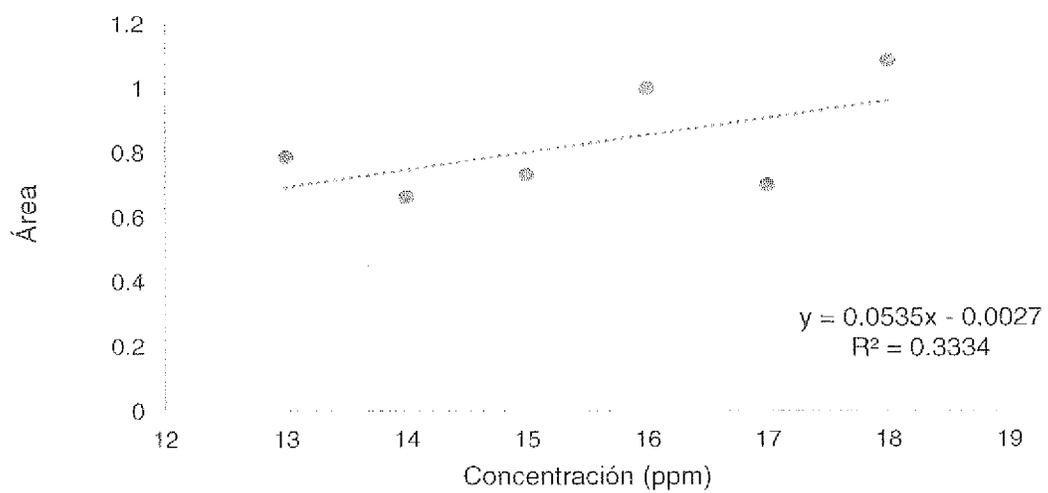
Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1. Desarrollo de la metodología para el análisis de nitritos en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante la técnica de Cromatografía de Iones

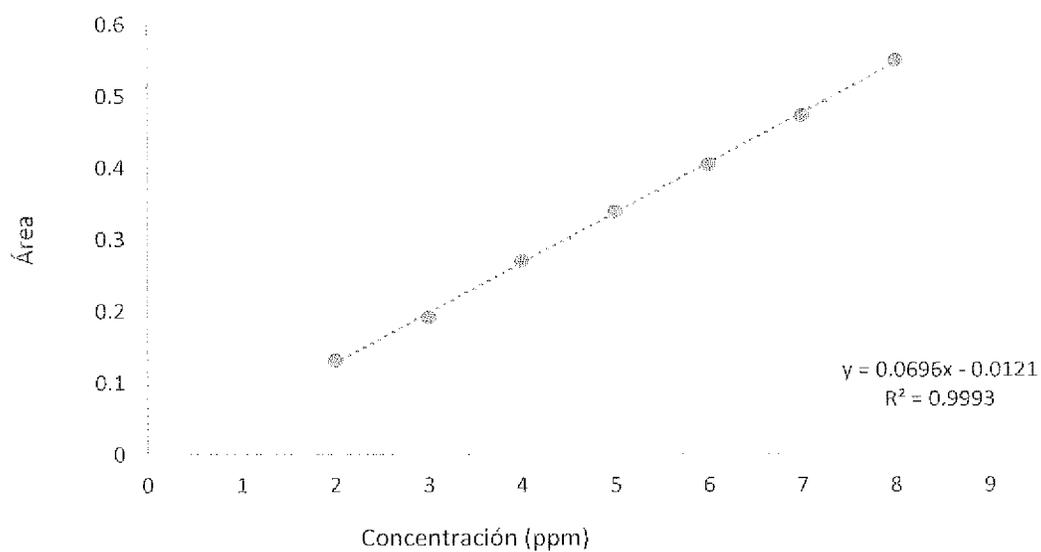
4.1.1. Determinación de ámbito lineal

Se hicieron pruebas para establecer el ámbito de trabajo en donde se presente una buena linealidad para la determinación del ion nitrito, esto, con el fin de obtener una ecuación de la recta adecuada (con $R^2 \geq 0.995$). Se encontró que a concentraciones entre 13.00 ppm – 18.00 ppm, los patrones no tenían un comportamiento lineal, lo que dio como resultado un R^2 de 0.3334. Este es un valor inadecuado para obtener resultados fidedignos mediante la ecuación de la recta, como se observa en la Figura 6a, los datos se encuentran totalmente dispersos y no siguen una secuencia lineal.

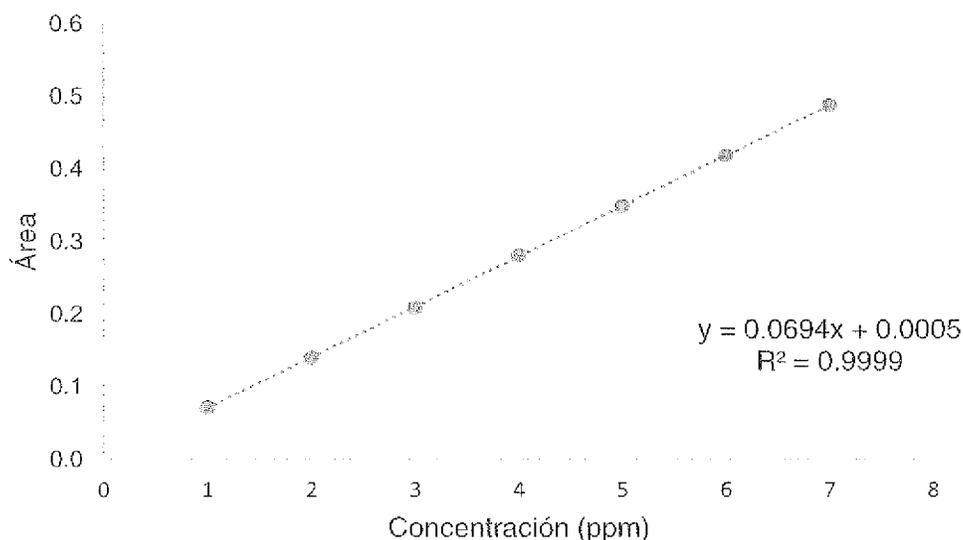
Por otra parte, en la Figura 6b se observa que los datos presentan una buena linealidad ($R^2 \geq 0.995$), por lo tanto, se determinó que a concentraciones entre 2.00 ppm – 8.00 ppm la linealidad fue de un R^2 de 0.9993. Esto demuestra que en el caso del anión nitrito se obtiene una mejor linealidad a valores de concentración bajos. Por este motivo, se decidió agregar un patrón menor a la curva de calibración (debido a que cuando se empezó a trabajar con las muestras se determinó que era necesario). Por lo tanto, las concentraciones de trabajo fueron de 1.00 ppm – 7.00 ppm para la determinación de nitrito de sodio en muestras de salchichón criollo y chicharrón, esta presentó también una buena linealidad (Figura 6c).



(a)



(b)



(c)

Figura 6. Pruebas de curvas de calibración (a), Curva de calibración de alto rango (b). Curva de calibración de bajo rango (c). Curva de calibración de trabajo

Fuente: elaboración propia.

4.1.2. Tratamiento de la muestra

4.1.2.1. Proceso de centrifugación

Se hicieron pruebas iniciales para la determinación del ion nitrito en las muestras de salchichón criollo, en las que se siguió el método AOAC 973.31 (2016) y se obtuvieron problemas en el proceso de filtración. Esto se debe a que las muestras de salchichón criollo tienen una gran cantidad de grasa, por lo que el proceso de filtración duró más de tres horas. Por tanto, se decidió centrifugar las muestras, con el fin de facilitar su filtración.

4.1.2.2. Interferencia de cloruros

En las primeras pruebas hechas con muestras de salchichón criollo, se obtuvo una interferencia en el cromatograma (Figura 7), el pico #26 correspondiente al ion cloruro, por su tiempo de retención (8.610 min). Se observa que la cantidad de cloruros es elevada, esto se debe a que la conductividad del pico encontrado oscila entre los 230 μS , el cual es un valor alto.

Además, la forma del pico, el cual tiende a inclinarse un poco hacia la derecha, es indicativo de que se trata de una alta concentración del ion, lo que afecta su cuantificación, además de opacar a otros iones cercanos. En este caso, el pico opacaba al pico de interés (nitrito); el cual tiene un tiempo de retención de aproximadamente 10.6-10.8 min, al estar tan concentrado el ion cloruro, la escala del cromatograma se ve afectada. Por esta razón, el pico de nitrito se ocultaba.

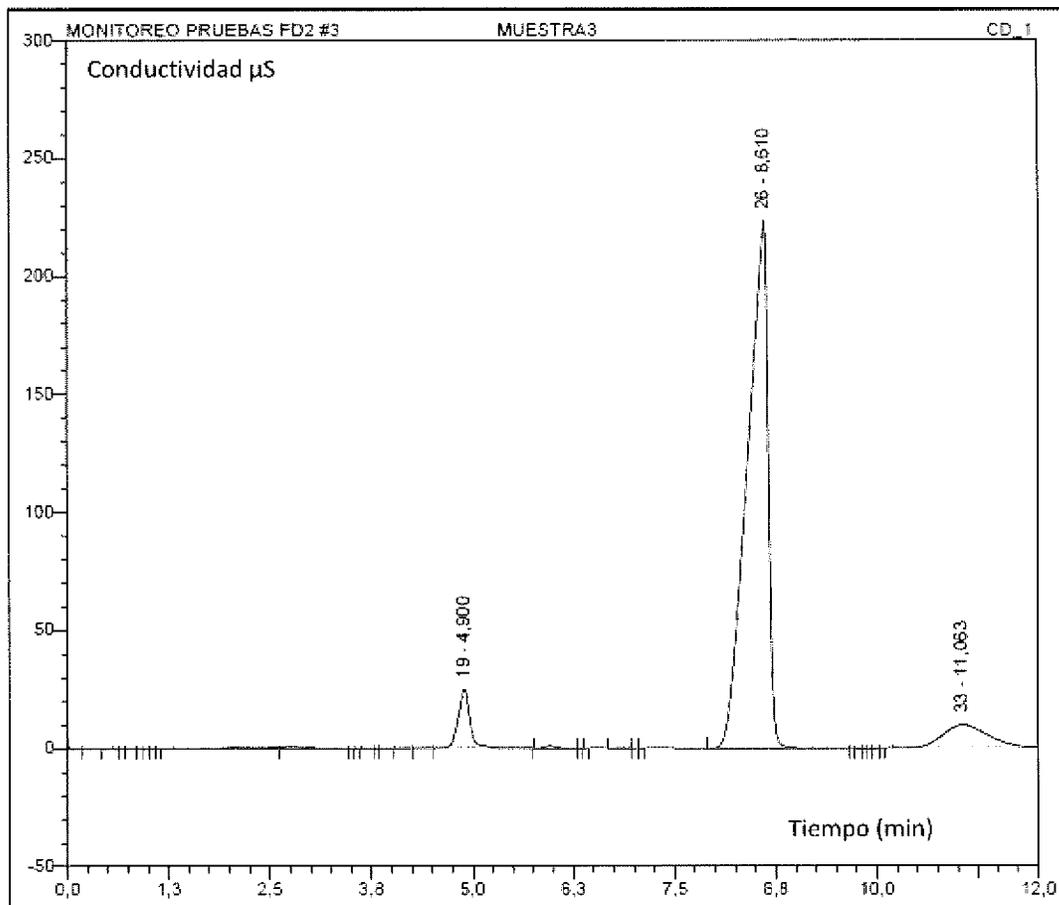


Figura 7. Cromatograma donde se muestra interferencia del ion cloruro

Fuente: elaboración propia, mediante Chromeleon c Dionex (1996-2008).

En un estudio hecho en nitrito de sodio en alimentos, entre estos embutidos, se encontraron diversas interferencias, entre las cuales se encontraba el cloruro. Cuando midieron por HPLC el efecto de la matriz se redujo en comparación con el método de colorimetría (Bahadoran *et al.*, 2016). En el caso de las muestras analizadas en este proyecto, la matriz tiende a ser más compleja, debido a que al tratarse de un producto que se fabrica por pequeños productores, existe poco control de calidad. Esto se evidenció mientras se hacían los análisis de las muestras, al observarse que estas eran

altamente grasosas y con contaminantes físicos que se encuentran prohibidos en la reglamentación.

Para solucionar la interferencia de cloruros, se llevó a cabo una modificación en el programa dentro del *software*, en el cual se le indicó que la obtención de datos en el cromatograma inicie a partir del minuto 10.00. Esto con el fin de que el pico correspondiente a cloruros no interfiera con el pico de interés. Además, se tomó como medida preventiva hacer una limpieza semanal a las columnas por la concentración elevada de cloruros, que genera una alta conductividad y por la cantidad de grasa presente en las muestras, lo cual podría causar un daño en las columnas.

Cabe resaltar que la concentración de iones cloruros, aunque sea pequeña, no pasa desapercibida, debido a que la cromatografía de iones, como es una técnica tan selectiva, va a encontrar esta concentración. No obstante, mediante esta técnica los picos pueden separarse y, de esta manera, impedir que el cloruro sea una interferencia. En cambio, por medio de colorimetría no se da una separación de los analitos, por lo que la señal de absorbancia puede verse afectada por la turbidez del cloruro (Bahadoran *et al.*, 2016).

4.2. Validación del método cromatográfico para el análisis de nitritos en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne

Al desarrollar un nuevo método para la determinación de un analito, el método debe validarse para comprobar la calidad de los datos (Miller y Miller, 2002; Vargas y Herrera, 2002; ECA, 2014). El alcance de la validación depende del tipo del método por validar, en este caso se cuenta con un método no normalizado, o bien desarrollado en el laboratorio (situación 3). Por lo tanto, se validaron los siguientes parámetros de desempeño, ámbito de trabajo,

linealidad, precisión, veracidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre y robustez (ECA, 2014).

Se inició con la determinación del ámbito de trabajo. Después de las pruebas para establecer el ámbito lineal (Figura 6), el ámbito de trabajo fue determinado a partir de siete patrones de nitrito con concentraciones entre 1.00 ppm - 7.00 ppm, las cuales un comportamiento lineal adecuado (con $R^2 \geq 0.995$).

A continuación, se llevó a cabo el parámetro de desempeño de la linealidad. En la Figura 8a se observan las curvas de calibración obtenidas por triplicado para el sistema en el rango de concentraciones establecido, además se muestran las ecuaciones de la recta obtenidas para cada curva de calibración; las cuales no presentan grandes diferencias entre sí. Asimismo, las tres curvas cuentan con un coeficiente de correlación adecuado ($R^2 \geq 0.995$).

También se hizo un análisis de los residuos correspondientes a la validación de la linealidad del sistema (Figura 8b), el comportamiento de los datos es aleatorio, lo cual indica que existe linealidad (Pérez y Rojas, 2016). Además, se evaluó la homocedasticidad, para comprobar la linealidad del método, la estimación de esta se llevó a cabo mediante el uso del *test* de Cochran, el cual se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$C = \frac{S_{m\acute{a}x}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2}$$

Al calcular el valor C, este se compara con los valores críticos establecidos para la prueba de Cochran, para el caso de la homocedasticidad del sistema, se obtuvo un valor C de 0,35 el cual es menor que el valor crítico 0,8534 (Cuadro 12, ubicado en el Apéndice). Esto demuestra que las

varianzas son iguales (Martel y Díez, 1996; Mongay, 2005) en el caso de las tres curvas preparadas, es decir, que existe un comportamiento homocedástico.

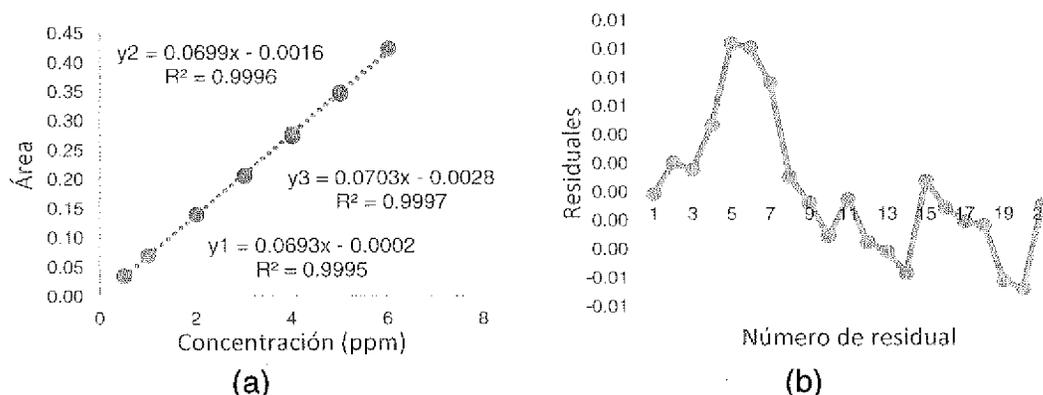


Figura 8. Gráficas para el parámetro de desempeño de linealidad (a), Superposición de curvas de calibración para comprobar linealidad del sistema (b). Análisis de residuales

Fuente: elaboración propia.

En relación con el parámetro de desempeño de precisión, se determinó la repetibilidad y la precisión intermedia del método. Como se observa en el Cuadro 5, el coeficiente de variación (CV) obtenido en ambos parámetros cumple con el criterio de aceptación, por lo tanto, se evidencia que el método cuenta con una precisión óptima. En cuanto a la veracidad (Cuadro 5), se observa que el valor obtenido para el sesgo relativo fue de 4.31 %, lo cual cumple con el criterio de aceptación e indica que este brinda resultados exactos y confiables.

En cuanto al parámetro de desempeño de selectividad, se llevó a cabo la confirmación de la identidad del analito, se verificó que el pico obtenido en el cromatograma correspondiera al ion nitrito, de acuerdo con su tiempo de retención. Además, se hicieron otras pruebas estadísticas para evaluar la selectividad, las cuales se detallan en la Sección 4.4.

Cuadro 5. Parámetros de desempeño del método de análisis de nitrito de sodio en productos de salchichón criollo y chicharrón de carne mediante cromatografía de iones

Parámetro de desempeño	Resultado	Criterio de aceptación
Ámbito de trabajo	1.0 - 7.00 ppm	$R^2 \geq 0.995$
	R^2 : 0.9998	
Linealidad	R^2_{C1} = 0.9998	$R^2 \geq 0.995$
	R^2_{C2} = 0.9999	
	R^2_{C3} = 0.9998	
Repetibilidad		
Desviación estándar	0.05	
Coeficiente de variación	CV: 1.68%	CVs 3
Reproducibilidad		
Desviación estándar	0.05	
Coeficiente de variación	CV: 1.01%	CVs 6
Veracidad		
Sesgo relativo	4.31 %	
% de recuperación	104.31%	Sesgo relativo < 10%
Selectividad	Se confirma que el pico es de nitrito.	Confirmación de la identidad del analito.
Límite de detección	0.0003 ppm	Para LMP ≥ 0.1 ppm un LD $\leq \frac{1}{10}$ LMP.
Límite de cuantificación	0.001 ppm	Para LMP ≥ 0.1 ppm un LQ $\leq \frac{1}{5}$ LMP.
Incertidumbre	0.5 ppm ⁽¹⁾	

(1): Incertidumbre máxima obtenida.

Fuente: elaboración propia.

Se procedió a la determinación de los límites de detección y cuantificación (Cuadro 5). El límite de detección dio como resultado 0.0003 ppm, este valor consiste en el nivel de señal en el que se puede encontrar el analito sin confundirlo con el ruido instrumental. Para el límite de cuantificación se obtuvo un valor de 0.001 ppm, este consiste en el nivel al cual la precisión de la medida permite una determinación adecuada (Vargas y Herrera, 2002). Además, se observa que ambos límites cumplen con los criterios de aceptación descritos en el Cuadro 5. A continuación, se determinó la incertidumbre de medición, en la que se tomaron en cuenta todos los componentes relacionados en el análisis de estudio, en la Figura 9 se observa cada uno de estos componentes. La incertidumbre dio como resultado 0.5 ppm.

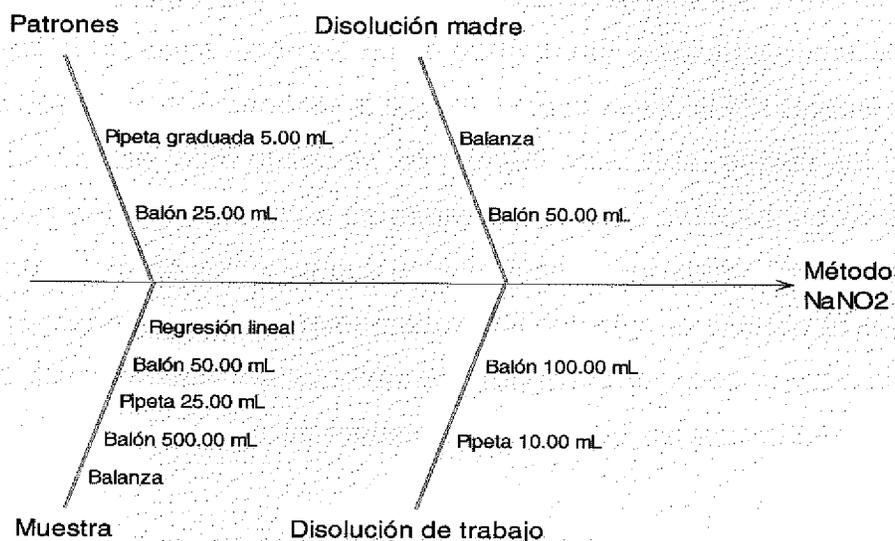


Figura 9. Diagrama de causa y efecto de los componentes relacionados en el análisis para la determinación de nitrito de sodio por cromatografía de iones

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

Finalmente, en relación con el análisis de robustez, se evaluaron seis

variables del método en desarrollo, para verificar si el método es robusto. Para esto, se eligieron seis variables críticas del método, la temperatura de digestión, el tiempo de digestión, el flujo de la fase móvil, el tiempo del centrifugado, tiempo de medición de degradación de la muestra y temperatura del detector.

En el Cuadro 13 (ubicado en el Apéndice), se evidencia cuáles son los factores que podrían afectar el método si son cambiados. Como se muestra en este cuadro, los factores críticos son la temperatura de digestión y el tiempo de digestión, esto se debe a que se relacionan directamente con la extracción de nitrito de sodio de la muestra. Si se modifican estos elementos el método no sería adecuado para la cuantificación de este analito.

El flujo de la fase móvil y el tiempo de medición de degradación de la muestra no se agregan en el cuadro, debido a que, al llevar a cabo la modificación en estos factores, no se pudo medir adecuadamente el analito. Esto se debe a que al cambiar el flujo de la fase móvil, el ion cloruro opaca al ion nitrito y no se logró observar, de manera adecuada, el pico del nitrito de sodio. Con respecto al tiempo de degradación de la muestra, no se encontró el pico del nitrito de sodio, ya que este se había degradado. Por otra parte, el tiempo de centrifugado y la temperatura del detector no afectan el método de análisis. Sin embargo, de acuerdo con todos los factores analizados, estos indican que el método no es robusto debido a que es susceptible a cambios en el mismo.

4.3. Verificación del contenido de nitritos en salchichón criollo y chicharrón de carne

Al añadir nitrito de sodio al producto cárnico, se producen distintas reacciones con los componentes del producto, lo cual implica que el nitrito de

sodio total disminuya, a través de las etapas de procesado, conservación, preparación y consumo. Esto relacionado con distintos factores, dependiendo del producto y de las condiciones de las etapas (Arnau, Guardia, Gratacós, Fernández, Hierro, Roncalés, Carballo, Villegas, Ruíz y Sanjuán, 2013). El nitrito residual es el que queda después de que disminuye la cantidad de nitrito adicionada al inicio y puede rondar en una disminución del 65 % (Vindas *et al.*, 2019). De acuerdo con Arnau *et al.* (2013), entre un 5 - 20 % del nitrito añadido inicialmente, se encuentra como nitrito residual al pasar por las etapas mencionadas

Es importante tener claridad que en el presente estudio se determinó la cantidad de nitrito de sodio residual en las muestras. Además, en el estudio de Vindas *et al.* (2019), se encontró que, a mayor cantidad de tiempo de almacenamiento menor cantidad de nitrito de sodio en el producto. Por lo tanto, en este trabajo se evitó tener los productos almacenado por muchos días (se almacenaron máximo tres días, además se hizo en condiciones de aislamiento de la luz, debido a que esta causa la descomposición del nitrito de sodio) (Vidal, 1997). Esto se llevó a cabo para evitar errores de medición.

4.3.1. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo

4.3.1.1. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo en

Grecia

El análisis de muestras se llevó a cabo en cinco cantones de la zona de Occidente, en el Cuadro 14 (ubicado en el Apéndice) y en la Figura 10 se observan los resultados correspondientes al cantón de Grecia. Dos de las muestras analizadas presentan concentraciones de nitrito de sodio residual superiores al valor permitido por la norma (125.00 ppm). Estas

concentraciones elevadas de nitrito de sodio, pueden ser peligrosas para el consumo humano, debido a que representan un problema por la formación de nitrosaminas, compuestos que; como se mencionó, tienen efectos cancerígenos (Corpet, 2011; Selbes, 2014; Rath y Reyes, 2015; Ruíz *et al.*, 2016).

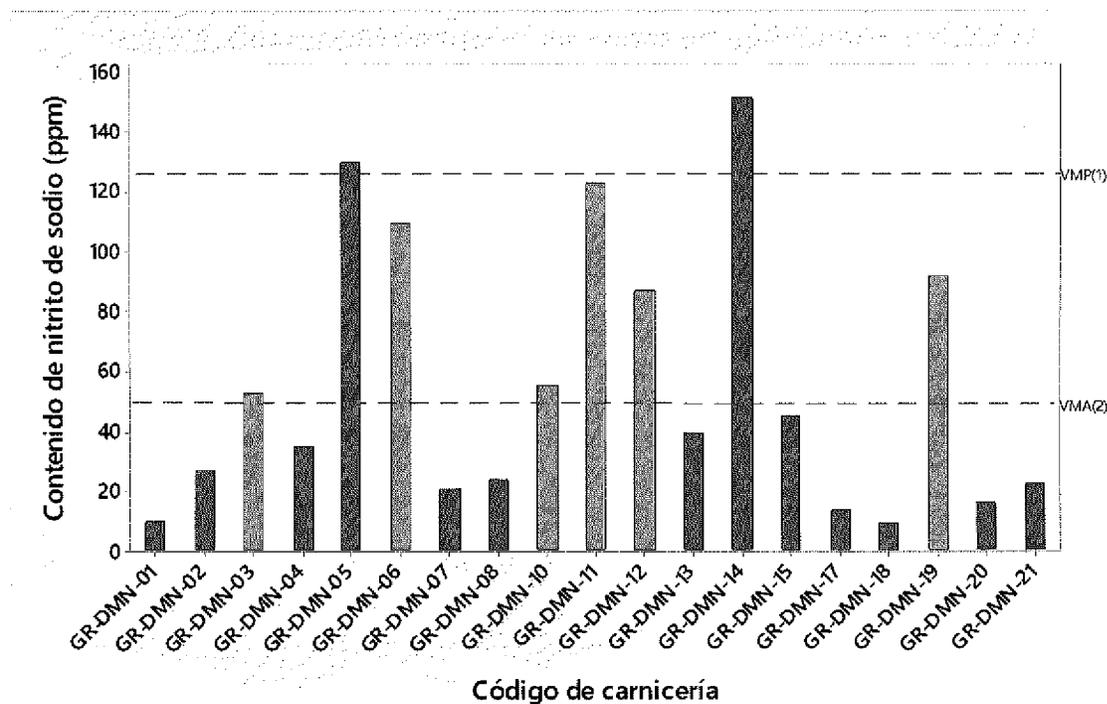


Figura 10. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de Grecia

(1): VMP: Valor máximo permitido

(2): VMA: Valor mínimo adecuado

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

Por otra parte, se observa en la Figura 10, que diez de las muestras analizadas presentaron concentraciones de nitrito de sodio residual menor a 50.00 ppm, aunque, la norma no indica un valor mínimo de nitrito de sodio. Sin embargo, de acuerdo con Shafiur (2007), se deben usar concentraciones

mayores a 100.00 ppm para proteger los productos cármicos de los microorganismos patógenos. Además, según Palaveciano y Palacio, 2017, es necesario que la concentración de nitrito de sodio se encuentre entre 50.00 ppm – 100.00 ppm para que el nitrito de sodio pueda inhibir adecuadamente el crecimiento de los microorganismos patógenos.

4.3.1.2. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo en Sarchí

Se observa en el Cuadro 14 (ubicado en el Apéndice) y en la Figura 11, los resultados correspondientes al cantón de Sarchí. Una muestra del total analizada presentó una concentración de 204.1(\pm 0.5) ppm, la cual sobrepasa el valor de nitrito de sodio permitido por la norma (125.00 ppm) e incluso sobrepasa el valor máximo indicado por la FDA (200.00 ppm). Por lo tanto, esta muestra es un peligro para el consumo humano.

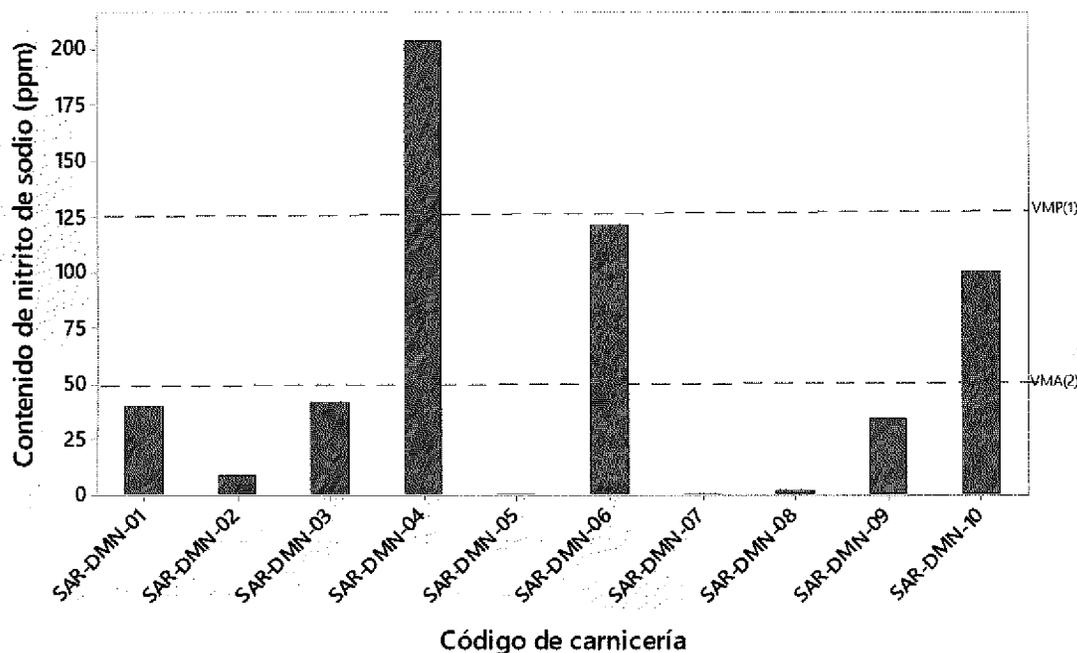


Figura 11. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de Sarchí

(1): VMP: Valor máximo permitido

(2): VMA: Valor mínimo adecuado

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

En el caso de las muestras correspondientes al cantón de Sarchí, se observa que, de un total de diez muestras, dos no fueron detectables. Esto puede indicar el uso de otros preservantes, o bien el no uso de estos y de acuerdo con el Decreto Ejecutivo n.º 35079-MEIC-MAG-S, publicado en La Gaceta n.º 45 del 5 de marzo del 2009, los embutidos deben contener nitrito de sodio como preservante. Es decir, en el caso de estas muestras en las que no fue detectable el nitrito de sodio, las mismas incumplen con el reglamento existente del país.

Además, de acuerdo con Honikel (2008), el nitrito de sodio tiene

mejores efectos preservantes. El cloruro de sodio, eritobato de sodio y el ascorbato de sodio, son coadyuvantes de curación que aceleran la conversión química de nitrito de sodio en óxido nítrico, de esta manera, mejora los efectos de inhibición del nitrito de sodio (Myers, 2015). Sin embargo, estos coadyuvantes por sí solos, es decir, en ausencia de nitrito de sodio, no van a lograr una inhibición de microorganismo adecuada (Myers, 2015), razón por la cual el Decreto Ejecutivo n.º 35079 indica su uso.

Por otra parte, se observa en la Figura 11 que siete de las muestras analizadas presentaron concentraciones de nitrito de sodio residual menor a 50.00 ppm. Esto indica que los productores pueden estar usando otro tipo de preservantes; sin embargo, no tendrán la misma eficacia que el nitrito de sodio (Honikel, 2008, Mital, 2012 y Amau *et al.*, 2013).

4.3.1.3. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo en Naranjo

Del total de las muestras analizadas correspondientes al cantón de Naranjo (Cuadro 14, ubicado en el Apéndice y en la Figura 12), ninguna presenta una concentración mayor al valor de nitrito de sodio permitido por la norma (125.00 ppm). Sin embargo, se observa que, de un total de diez muestras, dos no fueron detectables; además, las muestras NA-DMN-07, NA-DMN-08 y NA-DMN-09, presentaron valores que, aunque fueron detectables, no pudieron ser cuantificables. Estos resultados, al igual que en el caso de las muestras del cantón de Sarchí, podrían indicar el uso de otros preservantes, o bien el no uso de estos, lo cual incumple el Decreto Ejecutivo n.º 35079.

En el caso de las muestras NA-DMN-07, NA-DMN-08 y NA-DMN-09; las cuales presentaron valores apenas detectables, podría indicarse que la cantidad añadida al inicio del proceso de curado fuera insuficiente. Por esta

razón, al pasar por las diferentes etapas del proceso, la cantidad de nitrito residual sea apenas detectable. Esto indica falta de conocimiento de los productores sobre el proceso del curado del salchichón.

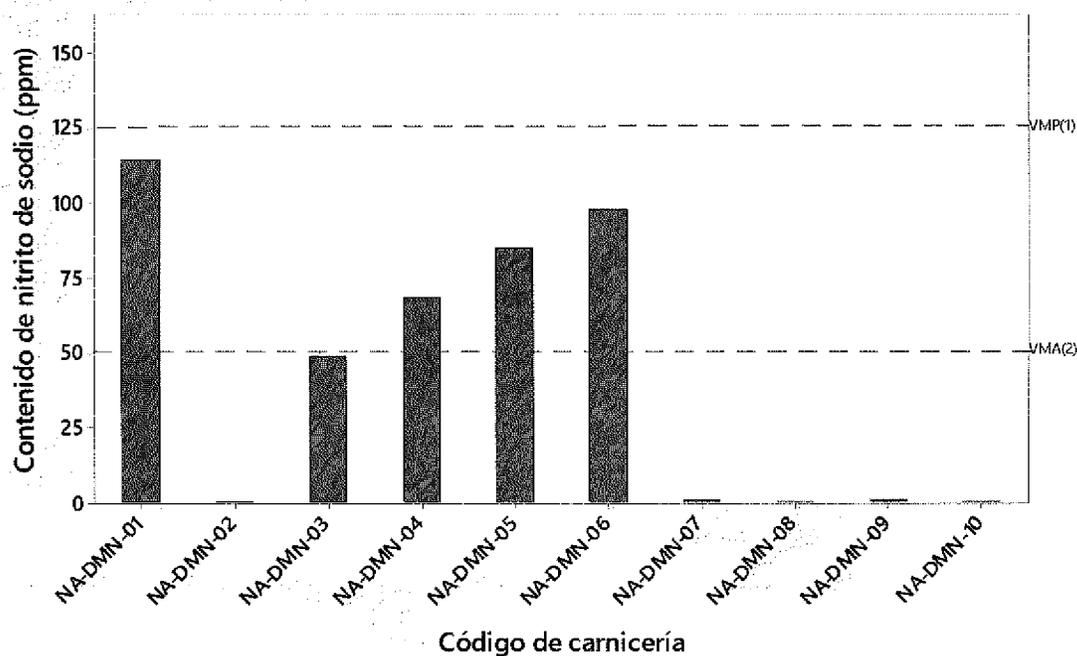


Figura 12. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de Naranjo

(1): VMP: Valor máximo permitido

(2): VMA: Valor mínimo adecuado

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

Por otra parte, se observa en la Figura 12 que seis de las muestras analizadas presentaron concentraciones de nitrito de sodio residual menor a 50.00 ppm. Por lo tanto, estas no contienen la cantidad adecuada de nitrito de sodio para inhibir los microorganismos patógenos (Shafiur, 2007; Palaveciano y Palacio, 2017).

4.3.1.4. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo en San Ramón

En relación con las muestras correspondientes al cantón de San Ramón (Cuadro 14, ubicado en el Apéndice y en la Figura 13), del total de analizado, solamente la muestra SR-DMN-01 presentó una concentración de 125.5 (\pm 0.3) ppm, la cual sobrepasa el valor máximo permitido por la norma (125.00 ppm). No obstante, este valor no se considera peligroso, debido a que solo lo sobrepasa por 0.5 ppm. Además, se observa que, de un total de 12 muestras, dos no fueron detectables y las muestras SR-DMN-07 y SR-DMN-10, presentaron valores apenas detectables, pero no pudieron ser cuantificables.

Por otra parte, se observa en la Figura 13 que cuatro de las muestras analizadas presentaron concentraciones de nitrito de sodio residual menor a 50.00 ppm. Esto indica una inhibición inadecuada de microorganismos patógenos en el salchichón criollo (Palavecino y Palacio, 2017).

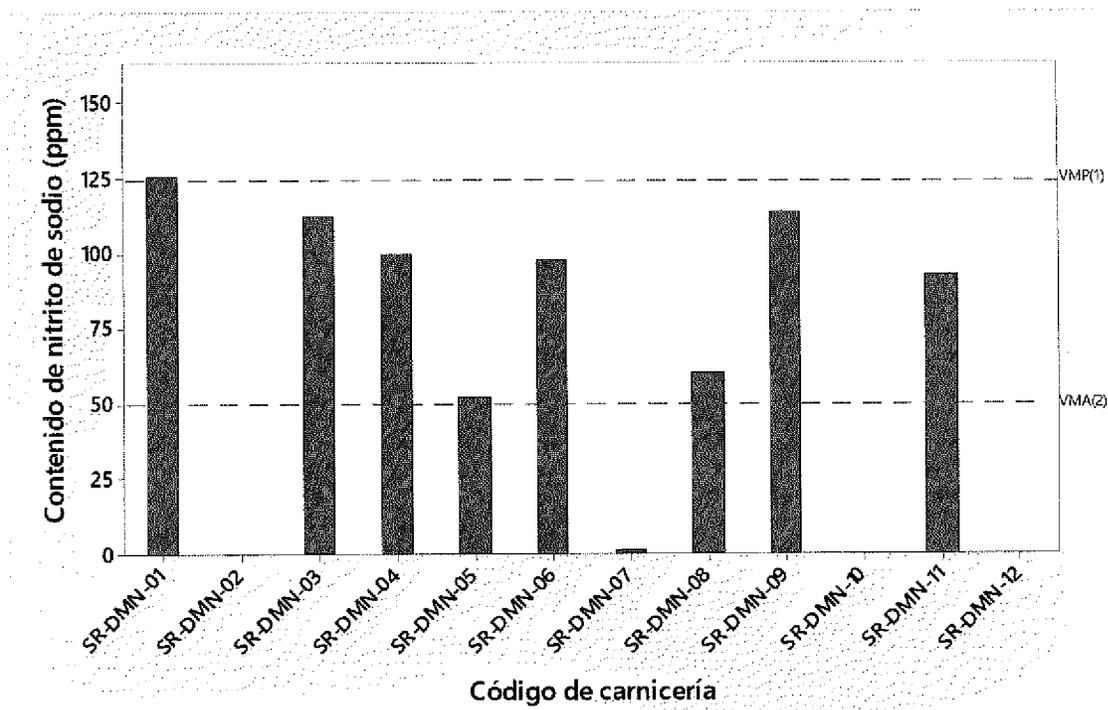


Figura 13. Contenido de nitrato de sodio en salchichón criollo, en el cantón de San Ramón

(1): VMP: Valor máximo permitido

(2): VMA: Valor mínimo adecuado

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

4.3.1.5. Contenido de nitrato de sodio en salchichón criollo en Palmares

Respecto a las muestras correspondientes al cantón de Palmares (Cuadro 14 ubicado en el Apéndice y en la Figura 14), ninguna de estas presenta una concentración mayor al valor de nitrato de sodio permitido por la norma (125.00 ppm).

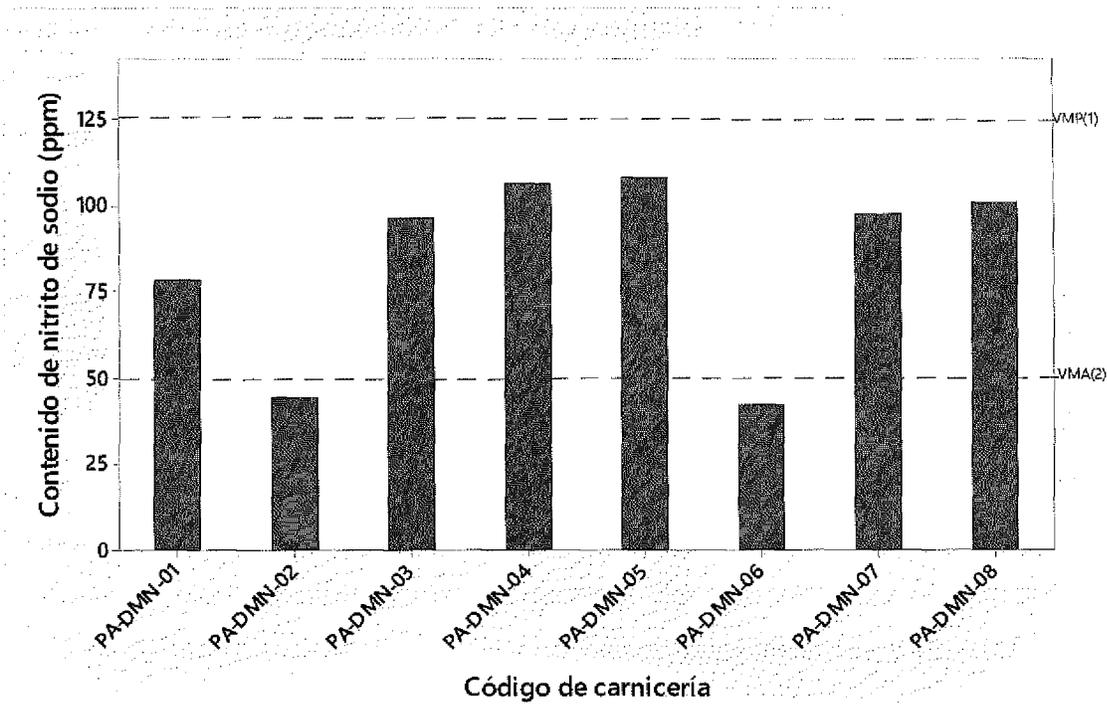


Figura 14. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en el cantón de Palmarenes

(1): VMP: Valor máximo permitido

(2): VMA: Valor mínimo adecuado

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

Se observa que, de un total de ocho muestras en el cantón de Palmarenes, todas cumplen con la norma estipulada. Por otra parte, en la Figura 14 se puede observar que dos de las muestras analizadas presentaron concentraciones de nitrito de sodio residual menor a 50.00 ppm; las cuales no son suficientes para proteger al salchichón del crecimiento de microorganismos patógenos.

En general, en los cinco cantones muestreados, un 71.2 % de las muestras analizadas cumplen con la cantidad de nitrito de sodio que indica la normativa, mientras que un 6.8 % (Figura 15) no la cumple. Esto se debe a

que las muestras sobrepasan el máximo permitido de la norma vigente, lo cual podría generar la formación de nitrosaminas, las cuales tienen efectos cancerígenos en los seres humanos (Rodríguez *et al.*, 2009; Mital, 2012; Selbes, 2014; Rath y Reyes, 2015). Además, pueden provocar problemas de salud graves en los consumidores, como la metahemoglobinemia (Basulto, Manera y Baladía, 2013; Ruiz *et al.*, 2016), por lo tanto, este 6.8 % representa el porcentaje de muestras que pueden perjudicar la salud de los consumidores.

En el Cuadro 15 (ubicado en el apéndice), se observa específicamente la cantidad de carnicerías que no cumplen la normativa por cantón muestreado. Se obtuvo que en total fueron cuatro carnicerías las que no cumplieron con lo estipulado por el decreto. Por otra parte, se obtuvo que un 11.9 % de las muestras analizadas no fueron cuantificables y un 10.2 % no fueron detectables (Figura 15).

Al tratarse de muestras de salchichón criollo; es decir, salchichón elaborado por pequeñas embutidoras y, en algunos casos, elaborados en las mismas carnicerías, no se sabe si los pequeños productores tienen un buen control sobre la cantidad de nitrito de sodio añadido. Por este motivo, en algunos casos las muestras no fueron detectables o cuantificables.

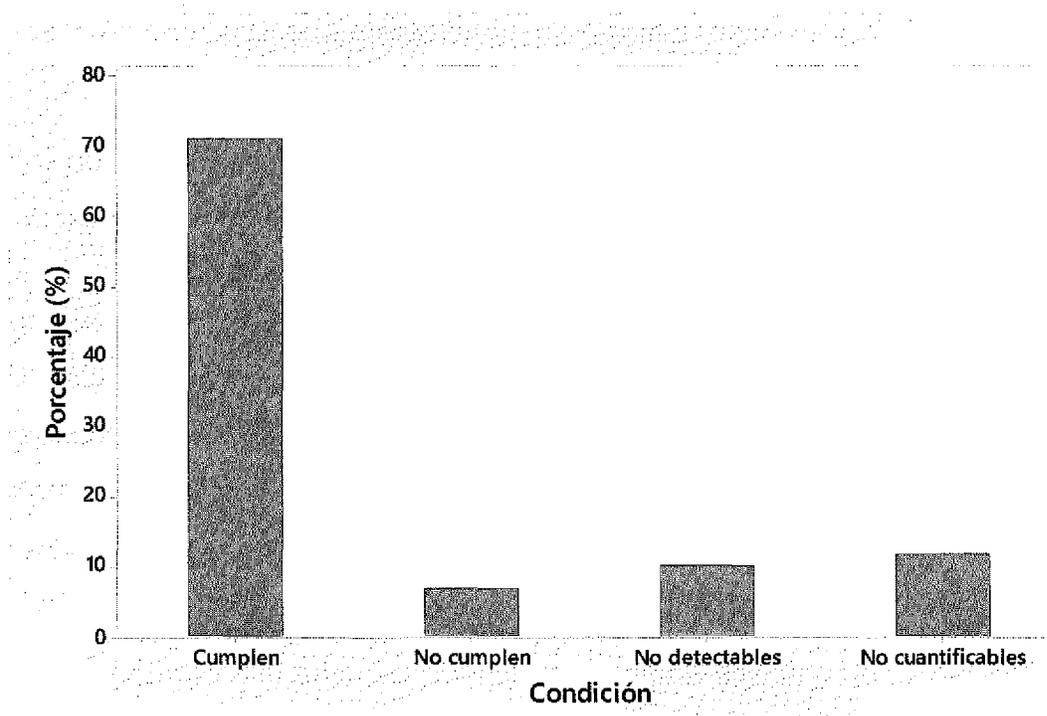


Figura 15. Distribución porcentual del cumplimiento del contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo, en todos los cantones analizados

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

Se observa que la mayoría de las muestras cumplen, de manera correcta, con lo estipulado por la normativa, sin embargo, existe un porcentaje de 50.8 % que contienen menos de 50.00 ppm de nitrito de sodio residual. Esto implica que estas muestras son susceptibles al crecimiento de patógenos, lo cual debe a que un embutido necesita cantidades mayores a 50.00 ppm de nitrito de sodio para que la inhibición de patógenos sea adecuada (Shafiur, 2007; Palaveciano y Palacio, 2017).

De acuerdo con el Cuadro 15 (ubicado en el apéndice), se observa específicamente la cantidad de muestras por cantón que presentaron cantidades menores a 50.00 ppm. Por lo que se determina que, para los cinco cantones muestreados en el caso de Grecia, Sarchí y Naranjo, se obtuvieron

mayores muestras que presentaban cantidades menores a 50.00 ppm.

En el caso de las muestras en las que apenas fue detectable, o bien no fue detectable el nitrito de sodio, es probable que se implemente el no uso o el uso de preservantes en el salchichón criollo como cloruro de sodio, eritobarto de sodio, entre otros, ya que se descarta que sea por tiempo de almacenamiento. Esto se debe a que se evitó mantener las muestras almacenadas por más de tres días y se almacenaron en condiciones de aislamiento de luz, para evitar la descomposición del nitrito de sodio. Sin embargo, como se mencionó, de acuerdo con Honikel (2008) y Myers (2015), aseguran que el nitrito de sodio tiene mejores efectos preservantes que estos otros coadyuvantes mencionados.

Aunado a lo anterior, aunque se agregue otro tipo de preservantes, el Decreto Ejecutivo n.º 35079 establece que se debe usar nitrito de sodio como preservante, por lo tanto, estas carnicerías estarían incumpliendo con el reglamento. Por esta razón, el reglamento lo establece, debido a que no se puede producir un embutido sin nitrito de sodio, ya que este protege al embutido de la bacteria *C. botulinium*, que es el microorganismo patógeno más crítico en los alimentos. Este puede causar botulismo alimentario (Argelich, Nogué, Soler y Serra, 2014), lo cual puede intoxicar a los consumidores de manera grave, además de provocar síntomas como náuseas, vómitos, fatiga y hasta la muerte en casos severos (Myers, 2015).

Asimismo, la incidencia relativamente baja del *C. botulinium* se debe a la adición del nitrito de sodio. Este se convierte en óxido nítrico para lograr la inhibición del *C. botulinium*, en la que los coadyuvantes de curación como el eritobarto de sodio y el ascorbato de sodio aceleran la conversión del nitrito de sodio (Myers, 2015).

Como se mencionó, se ha generado una discusión en el uso del nitrito

de sodio, debido a que se encontró que cantidades elevadas de este eran peligrosas (Ruíz *et al.*, 2016). Por esta razón, se han buscado otras alternativas para el curado de los embutidos, como el uso de otros preservantes. También se ha planteado reducir la cantidad de nitrito de sodio y se ha optado por la busca de preservantes orgánicos, sin embargo, no se ha encontrado un preservante tan eficaz como el nitrito de sodio. Incluso Myers (2015) indica que ha visto, a través de numerosos estudios, que el nitrito de sodio es un ingrediente insustituible en el campo de las carnes procesadas.

Además, de acuerdo con el estudio de Arnau *et al.* (2013), en el que probaron la reducción de la cantidad de nitritos añadidos del 25 % y 50 % con respecto al máximo permitido, se encontró que al reducir la cantidad de nitrificantes se facilitaba el crecimiento de microorganismos patógenos. Arnau *et al.* (2013), mencionan que los resultados obtenidos evidencian la importancia de una concentración adecuada de nitrificantes para controlar la cantidad de patógenos. Esto se debe a que al usar el máximo permitido no se encontraron microorganismos patógenos en el producto final, mientras que al reducir en un 50 % y un 75 %, se presentaron incrementos en los recuentos de las bacterias.

Por otra parte, en ensayos de inoculación de embutidos con *Listeria innocua* (como reemplazo de *Listeria monocytogenes*), dio como resultados que, en ausencia de sales nitrificantes, la bacteria se multiplicó durante la fase fermentativa del embutido. No obstante, en ensayos con presencia de nitrificantes se observó una inhibición desde las primeras etapas del proceso del embutido (Arnau *et al.*, 2013), esto evidencia la importancia en el uso del nitrito de sodio. Por este motivo, las muestras en las que no fue detectable, ni cuantificable el nitrito de sodio, representan un peligro para los consumidores, debido a que el embutido no es adecuado para la inhibición de microorganismos patógenos.

Con respecto al mercado orgánico y natural, este ha obtenido popularidad entre los consumidores, quienes han exigido productos sin preservantes. Esto ha llevado a que las industrias cárnicas usen alternativas de nitritos que se consideran ingredientes orgánicos, por ejemplo, el jugo y el polvo de apio, la lechuga, espinaca y remolacha que contienen altas cantidades de nitrato (nitrito entrante). Estas se pueden agregar a los productos cárnicos para obtener carnes curadas (Myers, 2015).

Aunque se ha demostrado que se pueden curar los productos cárnicos mediante el nitrato natural obtenido del polvo de apio, se ha evidenciado que estos no tienen el mismo nivel de seguridad en relación con el crecimiento de microorganismos patógenos en comparación con las carnes curadas de manera convencional. Esto se debe a la variabilidad y al menor nivel de nitrato/nitrito entrante en el polvo de apio (Myers, 2015).

4.3.2. Contenido de nitrito de sodio en chicharrón de carne

En cuanto a las muestras de chicharrón de carne, se observan los resultados obtenidos en el Cuadro 16 (ubicado en el apéndice) y en la Figura 17. Este tipo de muestra no se encuentra dentro de la norma vigente de embutidos, debido a que el chicharrón de carne no es un embutido. Se decidió considerar este tipo de muestra, ya que se ha observado que muchas veces el producto que se vende en las carnicerías presenta un color rojo, lo cual resulta sospechoso, pues este no es el color natural del chicharrón de carne. Esto podría indicar la adición del nitrito de sodio.

El chicharrón de carne, al no ser un embutido, no se encuentra regulado el uso de nitritos en este. Por lo tanto, no debería pasar por un proceso de curado, debido a que no es un producto que necesite preservarse por un periodo como los embutidos. Sin embargo, existen productos cárnicos que

pasan por procesos de curado, aunque no ocupen preservarse, el problema es que en Costa Rica no está regulado por la legislación que al chicharrón de carne se le añada nitrito de sodio. Por este motivo, no se le debería añadir nitrito de sodio, no obstante, se encontró, presencia de nitrito de sodio en algunos casos (Cuadro 16 y Figura 16).

En la carnicería GR-DMN-13 se obtuvo la mayor cantidad, una concentración de 54.8 (± 0.1) ppm, lo cual no es perjudicial para el consumo de acuerdo con la cantidad máxima de nitrito de sodio permitida por la legislación costarricense. No obstante, esta legislación aplica para los embutidos, que son productos cárnicos obtenidos a partir de una mezcla de carne picada y diferentes ingredientes. Entre estos se encuentran los preservantes como el nitrito de sodio, de manera que en el embutido se encuentran todos los ingredientes mezclados homogéneamente, mientras que el chicharrón no sucede esto. Por ende, en este producto la adición del nitrito de sodio no es de forma homogénea.

En el caso de las carnicerías GR-DMN-16, GR-DMN20, SAR-DMN-01, SAR-DMN-08, SR-DMN-01 y SR-DMN-07 no fue detectable el analito nitrito de sodio, en las demás carnicerías se encontró que presentaban cantidades inferiores a los 25 ppm de nitrito de sodio. Aunque son cantidades pequeñas, el nitrito de sodio no debería estar presente en este tipo de producto, ya que el mismo no necesita preservarse, por lo que se utiliza únicamente para aportar sabor al producto y para que este tenga el color rojizo característico de los embutidos. Sin embargo, al no estar el nitrito de sodio mezclado de forma homogénea, se desconoce lo que esto puede implicar al consumidor del producto.

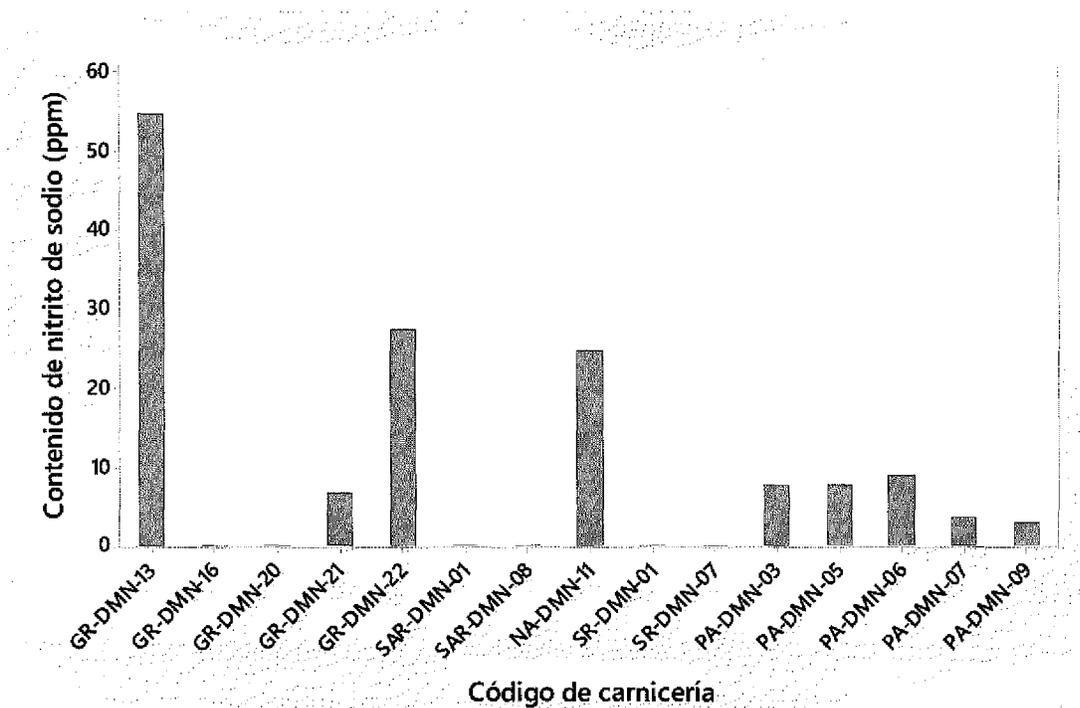


Figura 16. Contenido de nitrito de sodio en chicharrón de carne, en los cantones de Grecia, Sarchí, Naranjo, Palmares y San Ramón

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab, 2018.

Es importante mencionar que, en el caso de este producto, se hicieron muestras enriquecidas para asegurar que el analito encontrado en los cromatogramas se trataba del nitrito de sodio, con el fin de confirmar la identidad del analito encontrado. Esto debido a que al chicharrón originalmente no se le añade este analito, además, porque en algunos casos la cantidad de nitrito de sodio era tan poca que el pico no se observaba de manera adecuada. Por lo tanto, al enriquecer la muestra se solucionaba el problema.

4.4. Comparación de los métodos

Cuando se desarrolla un método nuevo para la determinación de un analito; en este caso de nitrito de sodio, el método debe validarse (Miller y

Miller, 2002; ECA, 2014). Esto mediante diferentes parámetros de desempeño como los descritos en la Sección 4.2, pero uno de los más determinantes es cuando se comparan los resultados obtenidos por el método desarrollado con los adquiridos mediante el método oficial. Lo anterior se debe a que el interés principal es la identificación de errores sistemáticos; es decir, evaluar si el método por desarrollar proporciona resultados significativamente más altos o más bajos que el procedimiento oficial (Miller y Miller, 2002).

Al inicio se llevó a cabo el contraste F para la comparación de las desviaciones estándar de los dos conjuntos de datos. Estos se obtuvieron por medio de los dos métodos para la determinación de nitrito de sodio, a través de cromatografía de iones (CI) y mediante el método oficial de la AOAC 973.31, por espectroscopia ultravioleta visible (UV). En este caso se hace el contraste de dos colas, ya que se prueba si las desviaciones estándar difieren en su precisión (Miller y Miller, 2002).

En este contraste se toma como hipótesis nula (H_0) que los dos métodos tienen varianzas iguales ($H_0: \theta_1 = \theta_2$), como se observa en el Cuadro 6 (y en Cuadro 17, ubicado en el apéndice). El valor crítico de F para dos colas ($F_g = 4.026$), es mayor que el F obtenido de 0.010, por lo tanto, la H_0 no se rechaza y se asume que las varianzas son iguales en esta prueba.

A continuación, se llevó a cabo una comparación de medias experimentales, con los resultados obtenidos, mediante CI y UV, en la que se tomó como hipótesis nula (H_0) que los dos métodos proporcionan el mismo resultado suponiendo que las varianzas son iguales ($H_0: \mu_1 = \mu_2$). Es decir, se prueba si existen diferencias significativas entre los promedios obtenidos por ambos métodos (Minitab, 2019).

Como se observa en el Cuadro 6 (y en Cuadro 18, ubicado en el apéndice), el valor crítico de t para dos colas ($t_{18} = 2.10$), es mayor que el t

obtenido de 0.34079, además, el valor p (0.34) obtenido, es mayor que el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$). Por lo tanto, la H_0 no se rechaza (Miller y Miller, 2002; Minitab 2019), es decir, que no existe diferencia significativa entre los resultados proporcionados por ambos métodos. Por ende, el método desarrollado en este estudio proporciona resultados igual de fidedignos que el método oficial.

Cuadro 6. Resumen de pruebas realizadas para la comparación de los métodos analíticos en muestras de salchichón criollo

	Valor F	Valor crítico F
Prueba F⁽¹⁾	0.010	4.026
	Valor t	Valor crítico t (dos colas)
Prueba t⁽²⁾	0.34079	2.10

(1) Prueba F para varianzas de dos muestras de salchichón criollo

(2) Prueba t para dos muestras de salchichón criollo suponiendo varianzas iguales

Fuente: elaboración propia.

Finalmente, se hizo un análisis de varianza de un factor (ANOVA), el cual consiste en una técnica estadística que se utiliza para separar y estimar las distintas causas de variación (Miller y Miller, 2002). En este estudio, se emplea para contrastar si el contenido de nitrato de sodio en la muestra de salchichón criollo presenta diferencias significativas al analizarse mediante CI y mediante UV. Se tomó como hipótesis nula (H_0) que las medias obtenidas por ambos métodos no presentan diferencia significativa ($H_0: \mu_1 = \mu_2$).

En el Cuadro 7 se observa que el valor p obtenido en el ANOVA (0.341), es mayor que el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula de que las medias de población son iguales. Es decir, que las medias obtenidas por ambos métodos de análisis no presentan diferencias significativas.

Cuadro 7. Análisis de varianza de un factor para la comparación de muestras de salchichón criollo

Fuente	GL ⁽¹⁾	SC Sec ⁽²⁾	SC Aj. ⁽³⁾	MC Aj. ⁽⁴⁾	Valor F	Valor p
Métodos	1	16.23	16.23	16.23	0.96	0.341
Error	18	305.08	305.08	16.95		
Total	19	321.31				

(1): Grados de libertad. (2): Suma de cuadrados. (3): Suma de cuadrados ajustado. (4): Media de cuadrados

ajustado

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab, 2018.

En cuanto a los valores obtenidos en el análisis, se observa en la Figura 18 a, los valores individuales en cada muestra, de modo que se pueden comparar los resultados obtenidos mediante los dos métodos (CI y UV). En este caso se nota que existe mayor dispersión en los datos que se obtuvieron por medio de UV, sin embargo, no se observan datos asimétricos, por lo que se puede mencionar que siguen una distribución normal, además, no se observan valores atípicos. En la Figura 18 b, se observa que la media obtenida por el método CI fue más baja que la que se obtuvo mediante UV, no obstante, no hay diferencia significativa entre las mismas.

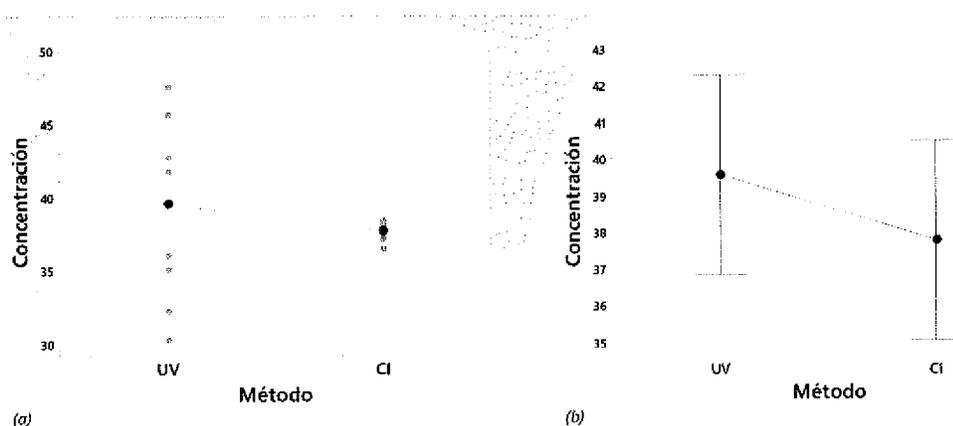


Figura 17. Valores de concentración (ppm) de la muestra de salchichón criollo (a), Gráfica de valores individuales (b). Gráfica de intervalos

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

En relación con los residuos para ANOVA de un solo factor, se elaboraron cuatro gráficas para observar el comportamiento de estos (Figura 18). En la Figura 18 a se muestra el gráfico de probabilidad normal, el cual permite verificar el supuesto de que los residuos están distribuidos de forma normal, los cuales deben seguir aproximadamente una línea recta (Minitab 2019, Vindas *et al.*, 2019). En este caso los residuos no siguen, de manera perfecta, una línea recta, pero se mantienen cercanos a la línea, además, no se muestran patrones que indiquen que los residuos no están distribuidos normalmente, por lo tanto, no hay evidencia de no normalidad.

En cuanto a la gráfica de residuo vs. ajustes (Figura 18 b), se observa que los puntos se ubican, de manera aleatoria, a ambos lados del cero, además no se encuentran patrones detectables en los puntos. Es decir, que los residuos se distribuyen aleatoriamente y tienen una varianza constante (Minitab, 2019). Para la gráfica de residuos vs. orden (Figura 18 d), la cual se emplea para verificar el supuesto de que los residuos son independientes entre sí, los residuos deberían mostrarse en la gráfica, de manera aleatoria, alrededor de la línea central, sin seguir tendencias ni patrones cuando se muestran en orden cronológico (Minitab 2019, Vindas *et al.*, 2019). En este caso, se observa (Figura 18 d) que los residuos parecen estar ubicados aleatoriamente alrededor de la línea central y no hay evidencia de que los residuos no sean independientes.

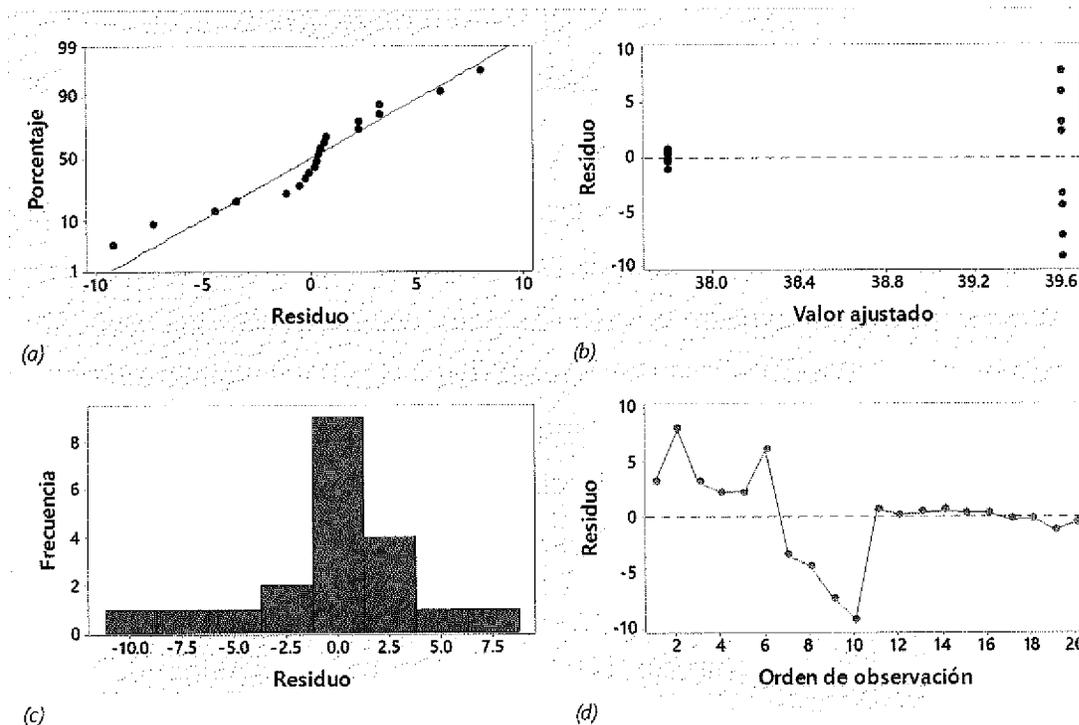


Figura 18. Gráficas de residuos para ANOVA de un solo factor en muestras de salchichón criollo. (a): Gráfica de probabilidad normal (b) vs. ajustes (c) Histograma (d) vs. Orden

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab, 2018.

Por otro lado, se llevó a cabo la misma prueba de comparación en el caso de la muestra de chicharrón de carne. Esto con el fin de asegurar que los dos productos analizados en este estudio no presenten diferencias significativas en los dos métodos analizados.

Se inició con el contraste F para la comparación de las desviaciones estándar de los dos conjuntos de datos, obtenidos mediante los dos métodos, CI y UV. En este caso se hace el contraste de dos colas, ya que se prueba si las desviaciones estándar difieren en su precisión (Miller y Miller, 2002). Se toma como hipótesis nula (H_0) que los dos métodos tienen varianzas iguales ($H_0: \theta_1 = \theta_2$), como se observa en el Cuadro 8 (y en el Cuadro 19, ubicado en el apéndice), el valor crítico de F para dos colas ($F_9 = 4.026$), es menor que el

F obtenido de 4.818. Por lo tanto, la H_0 se rechaza y se asume que las varianzas no son iguales en esta prueba.

Asimismo, se llevó a cabo una comparación de medias experimentales, con los resultados obtenidos de los dos métodos para la obtención de nitrito de sodio, mediante CI y mediante UV. En esta se tomó como hipótesis nula (H_0) que los dos métodos proporcionan el mismo resultado asumiendo varianzas desiguales ($H_0: \mu_1 = \mu_2$). De acuerdo con el Cuadro 8 (y en el Cuadro 20, ubicado en el apéndice), el valor crítico de t para dos colas ($t_{18} = 2.16$), es mayor que el t obtenido de 1.9645, además, el valor p (0.065) es mayor que el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$). Por lo tanto, la H_0 no se rechaza (Miller y Miller, 2002; Minitab, 2019).

Lo anterior indica que no existe diferencia significativa entre los resultados proporcionados por ambos métodos. Por este motivo, el método desarrollado en este estudio proporciona resultados fidedignos, al igual que el método oficial.

Cuadro 8. Resumen de pruebas hechas para la comparación de los métodos analíticos en muestras de chicharrón de carne

	Valor F	Valor crítico F
Prueba F⁽¹⁾	4.818	4.026
	Valor t	Valor crítico t (dos colas)
Prueba t⁽²⁾	1.9645	2.160

(1) Prueba F para varianzas de dos muestras de salchichón criollo. (2) Prueba t para dos muestras de salchichón criollo suponiendo varianzas iguales

Fuente: elaboración propia.

Por último, se hizo un análisis de varianza de un factor (ANOVA), el cual se utilizó para contrastar si el contenido de nitrito de sodio en la muestra de chicharrón de carne, presenta diferencias significativas al analizarse mediante

CI y mediante UV. Se tomó como hipótesis nula (H_0) que las medias obtenidas por ambos métodos no presentan diferencia significativa ($H_0: \mu_1 = \mu_2$).

En el Cuadro 9, se observa que el valor p obtenido en el ANOVA (0.065), es mayor que el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula de que las medias de población son iguales. Es decir, que las medias obtenidas por ambos métodos de análisis no presentan diferencias significativas. Por ende, el método desarrollado obtiene datos fidedignos, al igual que los que obtiene el método oficial.

Cuadro 9. Análisis de varianza de un factor para la comparación de muestras de chicharrón de carne

Fuente	GL (1)	SC Sec (2)	SC Aj. (3)	MC Aj. (4)	Valor F	Valor p
Métodos	1	10.89	10.89	10.885	3.87	0.065
Error	18	50.63	50.63	2.813		
Total	19	61.52				

(1): Grados de libertad. (2): Suma de cuadrados. (3): Suma de cuadrados ajustado. (4): Media de cuadrados ajustado

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

En relación con los valores obtenidos en el análisis, se observa en la Figura 19 a, los valores individuales para cada muestra, lo cual permite comparar los resultados obtenidos mediante los dos métodos (CI y UV). En este caso se nota que existe mayor dispersión en los datos obtenidos mediante CI, sin embargo, no se observan datos asimétricos. En el caso de CI se presentan los dos primeros datos (de abajo hacia arriba) que se encuentran un poco separados de los demás, no sin embargo, no se consideran atípicos, por lo que se puede mencionar que siguen una distribución normal. En la Figura 19 b, se observa que la media obtenida por el método UV fue más baja

que la obtenida mediante CI, no obstante, no hay diferencia significativa entre las mismas.

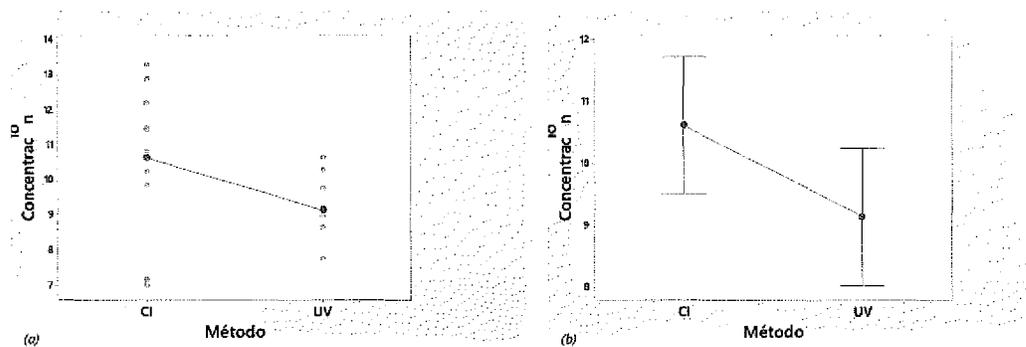


Figura 19. Valores de concentración (ppm) de la muestra de chicharrón de carne (a), Gráfica de valores individuales (b). Gráfica de intervalos

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab 2018.

En cuanto a los residuos para ANOVA de un solo factor, se elaboraron cuatro gráficas para observar el comportamiento de estos (Figura 20). En Figura 20 a se muestra el gráfico de probabilidad normal, en este caso los residuos se encuentran alrededor de la línea recta, se observan dos datos que se mantienen lejos de los demás. Sin embargo, no se consideran atípicos debido a que están cercanos a la línea recta, por lo tanto, no hay evidencia de no normalidad.

En cuanto a la gráfica de residuo vs. ajustes (Figura 20 b), se observa que los puntos se ubican de manera aleatoria, a ambos lados del cero, también dos datos que se encuentran alejados del resto. Sin embargo, no se consideran atípicos, los residuos se distribuyen aleatoriamente y tienen una varianza constante (Minitab, 2019). Para la gráfica de residuos vs. orden (Figura 20 d), se observa que los residuos parecen estar ubicados de manera

aleatoria alrededor de la línea central y no hay evidencia de que los residuos no sean independientes.

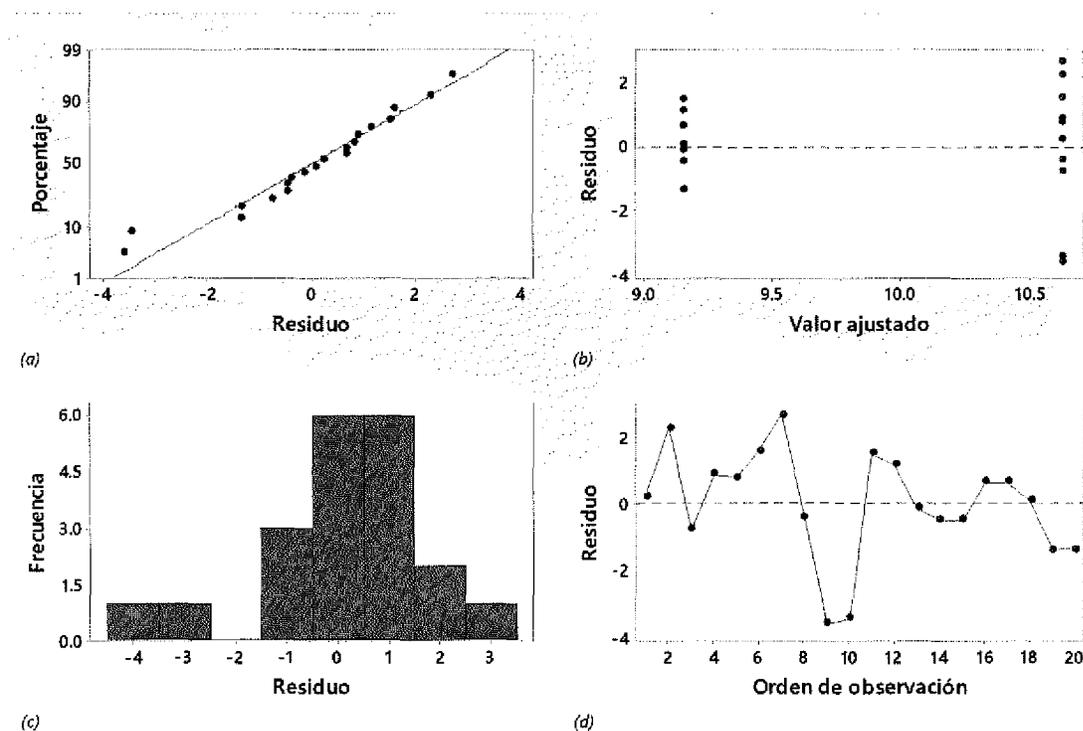


Figura 20. Gráficas de residuos para ANOVA de un solo factor. (a): Gráfica de probabilidad normal (b) vs. ajustes (c) Histograma (d) vs. Orden

Fuente: elaboración propia, mediante Minitab, 2018.

4.5. Análisis de costos de la metodología

Se establecieron los costos de los reactivos utilizados en la determinación del nitrito de sodio (NaNO_2), mediante cromatografía de iones (CI) y a través del método estándar de espectroscopia ultravioleta visible (UV). En el Cuadro 10 se muestran los costos que se requieren para llevar a cabo la determinación de NaNO_2 por el método propuesto CI y en el Cuadro 11, se muestran los costos requeridos mediante el método UV.

Cuadro 10. Análisis de costos, costos requeridos para el análisis de nitrito de sodio mediante cromatografía de iones

Reactivo	Cantidad requerida		Costo (colones)	
	Cl ⁽¹⁾ (por muestra)	Cl (por determinación ⁽²⁾)	Cl (por muestra)	Cl (por determinación)
Patrón				
Nitrito de sodio (NaNO ₂)	0.025 g	0.025 g	1028.45	1028.45
Fase móvil				
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	0.0057 g	0.0938 g	3.85	6.34
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0.014 g	0.023 g	0.64	1.05
Agua desionizada (para patrones y fase móvil)	483 mL	591 mL	202.21	253.73
Agua desionizada (por muestra)	540 mL	5400 mL	236.99	2318.38
	Total		1472.14	3607.95

⁽¹⁾ Cl: cromatografía de iones ⁽²⁾. Considerando 10 determinaciones

Fuente: elaboración propia.

En el Cuadro 10, se observa que el método propuesto requiere de reactivos para la elaboración de la fase móvil, los cuales no se contemplan en el método estándar. No obstante, en el método propuesto no se necesitan los reactivos para la generación del compuesto azoico coloreado (sulfanilamida y reactivo de NED).

Se puede observar que los costos (considerando diez determinaciones) son mayores para los reactivos generadores de color (Cuadro 11) el cual es de ₡3775.15, mientras que el costo de los reactivos para la elaboración de la fase móvil es de ₡1035.83 (Cuadro 10). Esto implica un ahorro del 73 % en los costos de los reactivos, si la determinación se hace por cromatografía de iones.

Cuadro 11. Análisis de costos, costos requeridos para el análisis de nitrito de sodio mediante espectroscopia ultravioleta-visible

Reactivo	Cantidad requerida		Costo (colones)	
	UV ⁽¹⁾ (por muestra)	UV (por determinación ⁽²⁾)	UV (por muestra)	UV (por determinación)
Patrón				
Nitrito de sodio (NaNO ₂)	0.025 g	0.025 g	1028.45	1028.45
Color				
Sulfanilamida	0.1333 g	0.2834 g	30.29	64.38
Reactivo de NED	0.0533 g	0.1134 g	171.66	364.88
Ácido acético	40 mL	85 MI	1090.56	2317.45
Agua destilada	575 mL	575 MI	368.40	368.40

Reactivo	Cantidad requerida		Costo (colones)	
(para patrones y fase móvil)				
Agua	540 mL	5400 MI	345.97	3459.73
destilada(por muestra)				
	Total		3035.33	7603.29

(¹) UV: Espectroscopia ultravioleta-visible (²). Considerando 10 determinaciones

Fuente: elaboración propia.

En la Figura 21 se observa la diferencia entre los costos de ambos métodos, considerando el costo por muestra, se determina que para el método propuesto (Cuadro 10) el valor es de ₡1472.14 y para el método estándar (Cuadro 11) es de ₡3607.95. Esto representa un ahorro del 59.20 % si la determinación se hace mediante cromatografía de iones. En caso de considerar diez determinaciones, el costo de estas para el método propuesto es de ₡3607.95 y mediante el método estándar el costo es de ₡7603.29, por lo que se denota un ahorro del 60.08 %

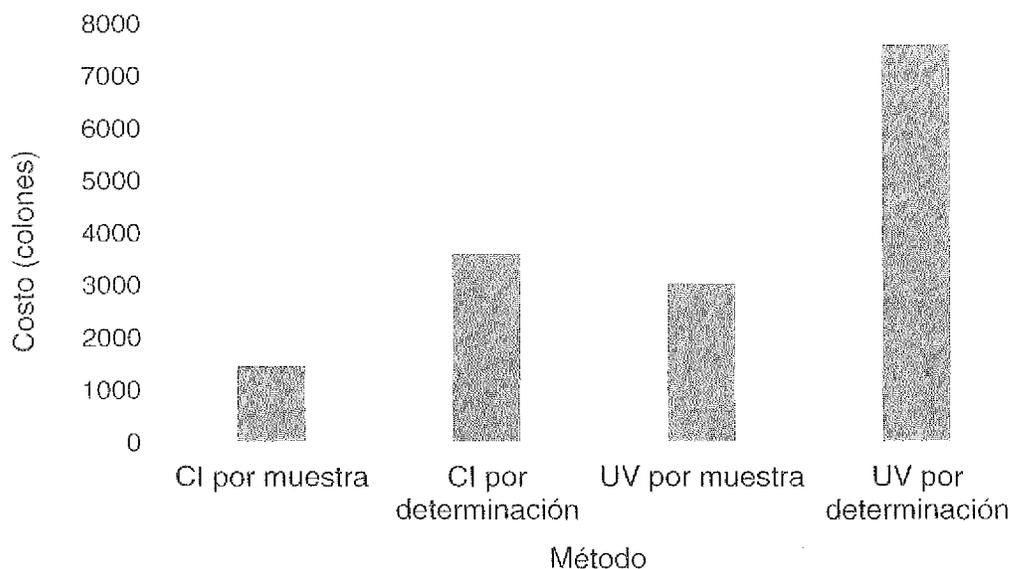


Figura 21. Comparación de costos de los métodos CI y UV

Fuente: elaboración propia.

Es importante tomar en cuenta que en un laboratorio no se analiza una sola muestra, ni solamente las diez determinaciones tomadas en cuenta en este cuadro, sino una gran cantidad de determinaciones cada día, lo cual ocasiona un mayor gasto de reactivos. Por lo tanto, para un laboratorio que cuente con estos dos equipos; es decir un espectrofotómetro ultravioleta-visible y un cromatógrafo de iones, el método de CI parece ser una mejor opción para una empresa que lleve a cabo una gran cantidad de determinaciones al día.

Además, cabe mencionar que el nitrito es un ion que se debe medir lo más rápido posible, debido a que este se oxida a nitrato al pasar el tiempo (Thermo Scientific, 2013; Vindas, *et al.*, 2019). No obstante, mediante CI el ion nitrito tiene una mejor estabilidad que por medio de UV. Esto se debe a que en el método de UV el nitrito de sodio se encuentra acoplado a la sulfanilamida y el reactivo de NED en condiciones ácidas, lo que genera un compuesto

azoico coloreado (Ruiten y Scherpenisse, 2011; Aydin, 2013), el cual no es estable por más de dos horas (Vargas, 1996). Por otro lado, por medio de cromatografía de iones se puede analizar una muestra hasta seis horas después de preparada y se obtienen resultados aceptables, de acuerdo con este estudio.

Aunado al beneficio económico, con respecto a los reactivos utilizados, es importante destacar que, si se usa el método por cromatografía de iones desarrollado en este estudio, se dejaría de usar los reactivos generadores de color del método oficial. Además de la sulfanilamida y el reactivo de NED, los cuales son tóxicos y exponen la salud de los analistas en alta medida.

Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Los resultados obtenidos para la validación del método de análisis de nitrito de sodio, usando cromatografía de iones, demuestran que cumplen con todos los parámetros de desempeño descritos en ECAMCPO01 Política de validación de métodos y ECAMCPO01G01 Guía para la validación de métodos (2014).
- El estudio estadístico comparativo entre el método desarrollado y el método oficial para cuantificar nitrito de sodio, demuestra que no hay diferencia significativa entre ambos. Esto indica que el método desarrollado aporta resultados igual de fidedignos y confiables que el método oficial.
- Con respecto al muestreo de salchichón criollo, los resultados indican que la mayoría cumplió con la norma vigente; sin embargo, existe un porcentaje (50.8 %) de muestras que contienen cantidades menores a 50.00 ppm. Esto evidencia una cantidad insuficiente de nitrito de sodio, lo que puede propiciar el crecimiento de microorganismos patógenos.
- Se evidenció que hay cantidades de nitrito de sodio cuantificables y detectables en las muestras de chicharrón de carne. Esto significa que el producto se encuentra adulterado con este preservante, debido a que no es un producto al cual se le regule el uso del nitrito de sodio.
- El estudio de costos de reactivos revela que existe un ahorro del

59.2 %, si se hace una determinación de nitrito de sodio por cromatografía de iones. Esta cifra de ahorro aumenta en un 60.1 % al considerar diez determinaciones, lo cual indica que el método desarrollado podría ser una mejor opción en una empresa en la que se haga el análisis de nitrito de sodio diariamente. Adicional al ahorro en reactivos, que representa el uso de esta técnica, se dejaría de usar los reactivos generadores de color (sulfanilamida y reactivo de NED) los cuales presentan alta toxicidad.

5.2. Recomendaciones

- Es recomendable llevar a cabo un estudio microbiológico en las muestras de salchichón criollo en las que se obtuvieron cantidades menores a 50.00 ppm de nitrito de sodio. Esto para determinar existencia o proliferación de microorganismos patógenos.
- Se aconseja ampliar el estudio en otras zonas del país, para que se obtengan más datos sobre la cantidad de nitrito de sodio agregada en el salchichón criollo. De esta manera, se podrá obtener un panorama nacional en cuanto a este producto.
- El método no es robusto en ciertos parámetros (temperatura y tiempo de digestión), por lo tanto, si este se replica en otro estudio, no se recomienda cambiar estos parámetros de la metodología.
- Debido a que algunas muestras (5) superaron el límite máximo de nitrito de sodio, se recomienda a los entes reguladores, tanto al Ministerio de Salud y a SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal), que se monitoreen las muestras producidas por pequeñas embutidoras. Esto para que se tenga el debido control de los embutidos que se consumen en el país.

- Es recomendable que los entes reguladores (Ministerio de Salud y SENASA), presten la atención a los productos como el chicharrón de carne que son adulterados con nitrito de sodio y que no se encuentran regulados por ninguna normativa en el país. Esto se debe a que el nitrito de sodio es un preservante que requiere el manejo de personal capacitado, porque este puede resultar peligroso para el consumo si no se agrega en las cantidades adecuadas.
- Es importante que los entes reguladores (Ministerio de Salud y SENASA) tomen medidas en cuanto a la venta de la sal de cura, ya que esta es de venta libre y cualquier persona sin ningún tipo de permiso o capacitación puede adquirirla.

Apéndices

Apéndice 1.

Cuadro 12. Resultados de la prueba de homocedasticidad

Estándar	Concentración (mg/L)	Área	Promedio	Desviación Estándar	Varianza
1A		0.0692			
1B	1	0.0704	0.0700	0.0007	0.0000003
1C		0.0704			
2A		0.1418			
2B	2	0.139	0.1400	0.0016	0.0000016
2C		0.1392			
3A		0.2117			
3B	3	0.207	0.2092	0.0024	0.0000037
3C		0.2089			
4A		0.2852			
4B	4	0.28	0.2815	0.0032	0.0000069
4C		0.2793			
5A		0.3613			
5B	5	0.3474	0.3516	0.0084	0.0000473
5C		0.3461			
6A		0.4314			
6B	6	0.4171	0.4216	0.0085	0.0000485
6C		0.4162			
7A		0.4993			
7B	7	0.486	0.4927	0.0067	0.0000295
7C		0.4928			
Máxima Varianza		0.00005	G calculado		0.35
Sumatoria Varianza		0.00014	G teórico		0.8534
Conclusión	No se rechaza la hipótesis nula, es decir, las varianzas son iguales.				

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 14. Contenido de nitrito de sodio en salchichón criollo en los cantones muestreados

Código Carnicería	Promedio nitrito de sodio (ppm)	Código Carnicería	Promedio nitrito de sodio (ppm)
GR-DMN-01	10.08 ⁽¹⁾	NA-DMN-01	114.9 ± 0.3
GR-DMN-02	27.05 ± 0.07	NA-DMN-02	ND ⁽³⁾
GR-DMN-03	52.9 ± 0.1	NA-DMN-03	49.1 ± 0.1
GR-DMN-04	34.97 ± 0.09	NA-DMN-04	68.7 ± 0.2
GR-DMN-05	129.6 ± 0.3 ⁽²⁾	NA-DMN-05	84.7 ± 0.2
GR-DMN-06	109.4 ± 0.3	NA-DMN-06	98.5 ± 0.2
GR-DMN-07	20.68 ± 0.07	NA-DMN-07	0.65 ⁽¹⁾
GR-DMN-08	23.63 ± 0.07	NA-DMN-08	0.45 ⁽¹⁾
GR-DMN-10	55.3 ± 0.1	NA-DMN-09	0.92 ⁽¹⁾
GR-DMN-11	123.0 ± 0.3	NA-DMN-10	ND ⁽³⁾
GR-DMN-12	86.9 ± 0.2	SR-DMN-01	125.5 ± 0.3 ⁽²⁾
GR-DMN-13	39.6 ± 0.1	SR-DMN-02	ND ⁽³⁾
GR-DMN-14	151.3 ± 0.4 ⁽²⁾	SR-DMN-03	112.5 ± 0.3
GR-DMN-15	45.2 ± 0.1	SR-DMN-04	99.8 ± 0.2
GR-DMN-17	13.44 ± 0.05	SR-DMN-05	52.4 ± 0.1
GR-DMN-18	9.46 ± 0.05	SR-DMN-06	98.3 ± 0.2
GR-DMN-19	92.0 ± 0.2	SR-DMN-07	1.67 ⁽¹⁾
GR-DMN-20	15.82 ± 0.05	SR-DMN-08	60.5 ± 0.2
GR-DMN-21	22.69 ± 0.07	SR-DMN-09	113.7 ± 0.3
SAR-DMN-01	40.1 ± 0.1	SR-DMN-10	0.61 ⁽¹⁾
SAR-DMN-02	9.23 ± 0.04	SR-DMN-11	93.4 ± 0.2

Código Carnicería	Promedio nitrato de sodio (ppm)	Código Carnicería	Promedio nitrato de sodio (ppm)
SAR-DMN-03	42.4 ± 0.1	SR.DMN-12	ND ⁽³⁾
SAR-DMN-04	204.1 ± 0.5 ⁽²⁾	PA-DMN-01	78.9 ± 0.2
SAR-DMN-05	ND ⁽³⁾	PA-DMN-02	44.8 ± 0.1
SAR-DMN-06	121.9 ± 0.3	PA-DMN-03	96.7 ± 0.2
SAR-DMN-07	ND ⁽³⁾	PA-DMN-04	106.6 ± 0.3
SAR-DMN-08	1.70 ⁽¹⁾	PA-DMN-05	108.1 ± 0.3
SAR-DMN-09	34.64 ± 0.09	PA-DMN-06	42.7 ± 0.1
SAR-DMN-10	100.5 ± 0.2	PA-DMN-07	98.1 ± 0.2
		PA-DMN-08	101.3 ± 0.2

(1) El dato es un aproximado, debido a que la señal obtenida no fue cuantificable dentro de la curva de calibración, sin embargo, fue detectable.

(2) Concentración superior a la norma.

(3) No detectable.

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 15. Resumen de la cantidad de carnicerías que cumplen y no cumplen la normativa, además de las que tienen cantidades menores y mayores a 50.00 ppm

Cantón	Cumplen normativa	No cumplen normativa	Cantidades menores a 50.00 ppm	Cantidades mayores a 50.00 ppm
Grecia	17	2	11	8
Sarchí	9	1	7	3
Naranjo	10	0	6	4
San Ramón	11	1	4	8
Palmares	8	0	2	6

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 16. Contenido de nitrito de sodio en chicharrón de carne en el cantón de Grecia, Sarchí, Naranjo, San Ramón y Palmares

Código Carnicería	Promedio nitrito de sodio (ppm)
GR-DMN-13	54.8 ± 0.1
GR-DMN-16	ND
GR-DMN-20	ND
GR-DMN-21	6.9 ± 0.1
GR-DMN-22	24.7 ± 0.2
SAR-DMN-01	ND
SAR-DMN-08	ND
NA-DMN-11	24.9 ± 0.2
SR-DMN-01	ND
SR-DMN-07	ND
PA-DMN-03	7.9 ± 0.1
PA-DMN-05	7.7 ± 0.1
PA-DMN-06	9.1 ± 0.1
PA-DMN-07	3.8 ± 0.1
PA-DMN-09	2.9 ± 0.1

⁽¹⁾ ND: No detectable

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 17. Prueba F para varianzas de dos muestras de salchichón criollo

	Variable 1	Variable 2
Media	37.7921	39.5927
Varianza	0.3479	33.5497
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9

	Variable 1	Variable 2
F	0.010	
Valor crítico para F (dos colas)	4.026	

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 18. Prueba t para dos muestras de salchichón criollo suponiendo varianzas iguales

	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)
Media	37.7921	39.5937
Varianza	0.3479	33.5497
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	16.95	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	-0.9785	
P(T<=t) una cola	0.17040	
Valor crítico de t (una cola)	1.73406	
P(T<=t) dos colas	0.34079	
Valor crítico de t (dos colas)	2.10092	

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 19. Prueba F para varianzas de dos muestras de chicharrón de carne

	Variable 1	Variable 2
Media	10.6227	9.1472
Varianza	4.6586	0.9669
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	4.818	
Valor crítico para F (dos colas)	4.026	

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 20. Prueba t para dos muestras de chicharrón de carne, suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	10.6226	9.1472
Varianza	4.6586	0.9669
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	1.9672	
P(T<=t) una cola	0.0354	
Valor crítico de t (una cola)	1.7709	
P(T<=t) dos colas	0.0708	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1603	

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2.

Cálculo de incertidumbre.

De acuerdo con formato elaborado en Microsoft Excel, elaboración propia.

Formato para la estimación de la incertidumbre del método de análisis para la determinación de nitró de sodio por Cromatografía de Iones		Código: FCI-2019		
		Emisión: 01		
		Fecha de Aprobación: MAYO 2019	Rige a partir de: JUNIO 2019	
		Elaborado por: Priscilla Rojas Avarado		
Tesis		Aprobado por: Laura Vindas A.		
Datos de la concentración de la disolución madre		Datos de la concentración de la disolución de trabajo		
Masa medida (g)	Balón ml	Pipeta ml	Balón ml	FD
0.025	50	10	100	0.1
Datos de la concentración de los patrones de la curva de calibración				
Patrón 1		1 ppm		
Patrón 2		2 ppm		
Patrón 3		3 ppm		
Patrón 4		4 ppm		
Patrón 5		5 ppm		
Patrón 6		6 ppm		
Patrón 7		7 ppm		
Componentes de la Incertidumbre				
Incertidumbre asociada a la preparación de la disolución madre (500 ppm)				
<i>Balanza</i>				
Tolerancia (g)	5.7735E-05	Repetibilidad (g)	0.0002	
μ Balanza		0.00021		
<i>Balón 50.00 ml</i>				
Balón 50 ml	Tolerancia	0.02041	Repetibilidad	0.01
μ Balón 50 ml		0.02911		
Incertidumbre estándar combinada de la concentración de la madre				
$\left(\frac{\mu \text{Masa Muestra}}{\text{Masa Muestra}}\right)^2$		0.00007		
$\left(\frac{\mu \text{Balón 50 ml}}{V \text{ Balón}}\right)^2$		0.00000034		
$\mu Cn \text{ madre} = Cn \text{ madre} \times \sqrt{\left(\frac{\mu \text{Masa Muestra}}{\text{Masa Muestra}}\right)^2 + \left(\frac{\mu \text{Balón 50 ml}}{V \text{ Balón}}\right)^2}$		4.17350		
$\mu Cn \text{ expandida} = 2 \times \mu Cn \text{ st}$		8.34699		

Incertidumbre asociada a la preparación de la disolución de trabajo (50 ppm)						
<i>Pipeta 10.00 ml</i>						
<i>Pipeta 10 ml</i>	Tolerancia	0.00816	Repetibilidad	0.004	Temperatura	0.00364
μ Pipeta 10 ml				0.00979		
<i>Balón 100.00 ml</i>						
<i>Balón 100 ml</i>	Tolerancia	0.04082	Repetibilidad	0.01	Temperatura	0.03637
μ Balón 50 ml				0.05558		
<i>Incertidumbre estándar combinada de la concentración de la disolución de trabajo</i>						
$\left(\frac{\mu\text{Pipeta } 10 \text{ mL}}{V \text{ Pipeta}}\right)^2$				0.000010		
$\left(\frac{\mu\text{Balón } 50 \text{ mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2$				0.00000031		
$\mu\text{Cn dsln trabajo} = \text{Cn dsln trabajo} \times \sqrt{\left(\frac{\mu\text{Pipeta } 10 \text{ mL}}{V \text{ Pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{\mu\text{Balón } 100 \text{ mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2}$				0.05630		
$\mu\text{Cn expandida} = 2 \times \mu\text{Cn st}$				0.11260		
<i>Incertidumbre asociada a la preparación de los patrones (misma para todos)</i>						
<i>Pipeta grad. 5.0 ml</i>						
<i>Pipeta 5 ml</i>	Tolerancia	0.01837	Repetibilidad	0.008	Temperatura	0.00182
μ Pipeta 10 ml				0.02012		
<i>Balón 25.00 ml</i>						
<i>Balón 25 ml</i>	Tolerancia	0.02449	Repetibilidad	0.008	Temperatura	0.00909
μ Balón 50 ml				0.02733		
<i>Incertidumbre estándar combinada de la concentración de la disolución de trabajo</i>						
$\left(\frac{\mu\text{Pipeta } 5 \text{ mL}}{V \text{ Pipeta}}\right)^2$				0.0000040		
$\left(\frac{\mu\text{Balón } 25 \text{ mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2$				0.00000007		
$\left(\frac{\mu\text{Cn dsln trabajo}}{\text{Cn dsln trabajo}}\right)^2$				0.00000507		
$\mu\text{Cn patrón} = \text{Cn patrón} \times \sqrt{\left(\frac{\mu\text{Pipeta } 5 \text{ mL}}{V \text{ Pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{\mu\text{Balón } 25 \text{ mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2 + \left(\frac{\mu\text{Cn dsln trabajo}}{\text{Cn dsln trabajo}}\right)^2}$				0.02426		
$\mu\text{Cn expandida} = 2 \times \mu\text{Cn st}$				0.04852		

Datos de muestras									
Número de muestra	Masa medida (g)	Área	m	b	FD	Balón	Concentración Nitratos (ppm)	Promedio Masa	50.00051
1	50.00012	0.3334	0.0694	0.0005	2	0.5	95.93636918	Promedio Nitratos ppm	99.24968227
2	50.0009	0.3564	0.0694	0.0005	2	0.5	102.5629954	Desviación estándar	4.685732314
								Promedio Área	0.3449
Incertidumbre asociada a la muestra									
Estándar combinada a partir de datos obtenidos en la regresión lineal									
$S_{x_0} = \frac{S_y/x}{m} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{m^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$									
S _{y/x} = Error típico.								0.001276659	
m = Pendiente								0.0694	
n = Número de patrones.								7	
y = Área medida.								0.3449	
ȳ = Área promedio.								0.3449	
(y ₀ - ȳ) ²								0.00013225000000	
x = Concentración de cada patrón.									
x̄ = Concentración promedio.								4	
∑(x _i - x̄) ²								28	
S _{x0}								0.02543	
Balanza									
Tolerancia (g)	5.7735E-05			Repetibilidad (g)			0.0002		
μ Balanza								0.00021	
Balón 500.00 ml									
Balón 500 ml	Tolerancia	0.08165		Repetibilidad		0.05	Temperatura	0.18187	
μ Balón 50 ml								0.20553	
Pipeta									
Pipeta 25 ml	Tolerancia	0.01225		Repetibilidad		0.008	Temperatura	0.03182	
μ Pipeta 25 ml								0.01474	
Balón									
Balón 50 ml	Tolerancia	0.04082		Repetibilidad		0.01	Temperatura	0.01819	
μ Balón 50 ml								0.04580	

<i>Incertidumbre estándar combinada de la concentración de la madre</i>	
$\left(\frac{\mu \text{Masa Muestra}}{\text{Masa Muestra}}\right)^2$	0.0000000002
$\left(\frac{\mu \text{Balón 500 mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2$	0.00000017
$\left(\frac{\mu \text{Pipeta mL}}{V \text{ Pipeta}}\right)^2$	0.00000035
$\left(\frac{\mu \text{Balón 50 mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2$	0.00000084
$\left(\frac{\mu \text{Cn (Sxo)}}{\text{Cn}}\right)^2$	0.00000007
$\mu \text{Cn muestra} = \text{Cn muestra} \times \sqrt{\left(\frac{\mu \text{Masa Muestra}}{\text{Masa Muestra}}\right)^2 + \left(\frac{\mu \text{Balón 500 mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2 + \left(\frac{\mu \text{Pipeta mL}}{V \text{ Pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{\mu \text{Balón 50 mL}}{V \text{ Balón}}\right)^2 + \left(\frac{\mu \text{Cn (Sxo)}}{\text{Cn}}\right)^2}$	0.11832
$\mu \text{Cn expandida} = 2 \times \mu \text{Cn st}$	0.23665
$\mu \text{Cn Nitritos}$	0.24

Referencias bibliográficas

- Alfa Aesar. (2015). Ficha de datos de seguridad, según 1907/2006/CE, Artículo 31.
- AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC International.
- Araya, Y.; Jiménez, A.; Ivankovich, C. y García, M. (2014). Hábitos de consumo de embutidos en el cantón de San Carlos y el área metropolitana de Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 27(4), (114-124).
- Argelich, R.; Nogué, S.; Soler, X. y Serra, N. (2014). Brote familiar de botulismo alimentario. *Medicina Clínica* 142(3), (137-138).
- Arнау, J.; Guardia, M.; Gratacos, M.; Fernández, M.; Hierro, E.; Roncalés, P.; Carballo, J.; Villegas, B.; Ruiz, J. y SanJuan, N. (2013). Implicaciones de la reducción de los niveles de uso de nitratos y nitritos en la seguridad, conservación, características sensoriales y modificaciones tecnológicas de los productos cárnicos. Proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA CSD2007-00016.
- Aydin, A. (2013). Nitrites and Nitrates. En, L. De Gelder (3.^a ed.). *Handbook of Water Analysis*. (283-325). doi: 10.1201/b15314-17
- Basulto, J.; Manera, M. y Baladia, E. (2013). Contenido de Nitrito de Sodio y Bases Volátiles Nitrogenadas Totales en el Salchichón Producido por Empresas Embutidoras Nacionales. *Pediatría Atención Primaria* 15 (65-69).
- Bahadoran, Z.; Mirmirana, P.; Jeddib, S.; Azizic, F.; Ghasemib, A. y Hadaeghd, F. (2016). Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits,

grains, legumes, dairy products, meats and processed meats. *Journal of Food Composition and Analysis* 51(93–105). doi: 10.1016/j.jfca.2016.06.006

Barrantes, T. (2009). Principales Causas de Cáncer Atendidas en un Centro Hospitalario. Costa Rica 2003-2007. *Revista Costarricense de Salud Pública* 18(1), (37-49).

Bedolla, S. (2003). *Introducción a la tecnología de alimentos* (2.^a ed.).

Caja Costarricense del Seguro Social. (2014). *Indicadores de Género y Salud Costa Rica 2014*.

Castro, M.; Alcántara, L.; Colón y Clavé, M. (1996). *Cocina dominicana*.

Connors, K.; Guzmán, M. y García, A. (1980). *Curso de análisis farmacéutico: (ensayo del medicamento)*.

Corpet, D. (2011). Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer. *Meat Science* 89, (310–316).

De la Cruz, E. (1958). Epidemiología de la Salmonelosis en Costa Rica II. Salmonelas en carnes procesadas. *Revista Biología Tropical* 6(1), (37-41).

Decreto N.º 35079-MEIC-MAG-S. (2009). *Productos cárnicos embutidos: salchicha, salchichón, mortadela y chorizo. Especificaciones*.

Diario Médico Madrid. (2012). *Relacionan los embutidos con reingreso por EPOC*.

Ente Costarricense de Acreditación (ECA). (2014). *Guía para la validación de*

métodos.

Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Recuperado de: www.eurachem.org

Euromonitor International. (2016). Processed meat and seafood in Costa Rica. Passport.

Ferreira, I. y S. Silva. (2008). Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/ diode array detector. *Talanta* 74, (1598-1602).

Flores, E.; Zalazar, R.; Ayala, P.; Hernáez, L.; Figueroa, L. y Bello, M. (2016). Determinación de nitritos y nitratos en productos cárnicos por hplc de par iónico. *Revista SENASA-Argentina*.

Gismera, M.; Quintana, M. y Silva de Campos, M. (2009). Introducción a la cromatografía líquida en alta resolución.

Guzmán, J. (2005). Estudio Analítico de Sulfamidas, Compuestos Asociados y Productos de Degradación Mediante Nuevos Métodos de Separación (Tesis Doctoral). Universidad de Castilla-La Mancha, España.

Harris, D. (2001). Análisis químico cuantitativo

Harris, D. (2007). Análisis químico cuantitativo.

Honikel, K. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* 78, (68–76).

- Hospital, X.; Temprano, L.; Hierro, E.; Fernández, M. y García de Fernando, G. (2018). Efecto del pH y de la concentración de nitrito en la velocidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. In: Nuevas tendencias en microbiología de alimentos Sesión 3ª XX1 Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos (SEM), Ed. Universitat Rovira i Virgili, 180, 181.
- Iammarino, M.; Di Taranto, A. y Cristino, M. (2013). Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring. *Food Chemistry*, 140(1), 763-771. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.094
- Jarrell, K. (2012). Regulatory History: Elixir Sulfanilamide. *Journal of GXP Compliance Summer* 16(3), 12-14.
- Lepe, J.; Aguilar, L. y Godínez, N. (2015). Metahemoglobinemia adquirida en el recién nacido asociada con benzocaína y paracetamol. *Boletín Infantil del Hospital de México* 72(4), (271-275).
- Levin, F. (1990). Caracterización química del salchichón en Costa Rica (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, San José.
- Levin, R. y Rubin, D. (2004). Estadística para administración y economía.
- Lizardi, M.; Portugal, J.; Ramírez, E.; Coy, I. y Verdugo, E. (2009). Diseño del proceso productivo de una empresa seño del proceso productivo de una empresa procesadora de embutidos de camarón de pacotilla para su integración al DIAPYME.
- López, C.; Viera, I. y Urbano, A. (2016). Development and validation of an ionic chromatography method for the determination of nitrate, nitrite

and chloride in meat. *Food Chemistry* (194), 687-694.

Martel, P. y Díez, J. (1996). *Probabilidad y estadística en medicina: aplicaciones en la práctica clínica y en la gestión sanitaria*.

Mauri, A.; Llobat, M. y Herráez, R. (2010). *Laboratorio de análisis instrumental*.

Merck. (2014). *Ficha de datos de seguridad de acuerdo con el Reglamento (CE) n.  1907/2006*.

Miales, J. (1985). *Hematología, medicina de laboratorio*.

Miller, J. y Miller, J. (2002). *Estadística para química analítica*.

Ministerio de Salud. (2001). *Encuesta Nacional de Nutrición. Fascículo Consumo de Alimentos*. San José, Costa Rica.

Ministerio de Salud. (2013). *Encuesta Nacional de Nutrición. Fascículo Consumo de Alimentos*. San José, Costa Rica.

Minitab. (2019). *Minitab reference manual: Macintosh versión, release 8*. State College, PA: Minitab.

Mital, S. (2012). *HPLC of Nitrosamines in Food and Other Matrices*. En, L., Nollet y, F. Toldra (3.  ed.). *Food Analysis by HPLC*. (893-922).

Mongay, C. (2005). *Quimiometría*.

Morales, P. y Bosch, F. (2007). *Hechos históricos de las sulfamidas divulgados por la prensa: el caso de The New York Times*. *Medicina Clínica* 128 (17), 660-664.

Myers, M. (2015). *Efficacy of decreased nitrite concentrations on Clostridium*

perfringens outgrowth during an Appendix B cooling cycle for ready-to-eat meats (Tesis de maestría). Universidad del Estado de Iowa, Estados Unidos.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne procesada. Comunicado de prensa del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer.

Palaveciano, F. y Palacio, M. (2017). Determinación de la concentración de nitritos en salchichas tipo Viena de marcas comerciales (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Promega. (2009). Technical Bulletin. Griess Reagent System, Instructions for use of product G2930.

Quintero, R. y López-Munguía, A. (1993). Biotecnología alimentaria.

Rath, S. y Reyes, F. (2015). Nitrosamines. En, L., Nollet y, F. Toldra (3.^a ed.). Handbook of Food Analysis Two Volume Set. (Vol II-289–Vol II-299).

Rodríguez, J.; Vargas, É. y Gómez, M. (2009). Procesos Industriales: manual de laboratorio para el análisis químico y control de calidad. Heredia, Costa Rica: Editorial Universidad Nacional (EUNA).

Ruiter, A. y Bergwerff, A. (2005). Methods of Analysis of Food Components and Additives. En, S. Othles. Methods of Analysis of Food Components and Additives.

Ruiter, A. y Scherpenisse, P. (2011). Analysis of Chemical Preservatives in Foods. En S. Othles (2.^a ed.). Methods of Analysis of Food

Components and Additives (423-435).

Ruíz, C.; Herrero, A. y Jiménez, F. (2016). Determination of Nitrates and Nitrites. En, C. Ruiz y, L. Nollet. Flow Injection Analysis of Food Additive (135-152).

Ryser y Marth, E. (2007). Listeria, listeriosis and food safety.

Sánchez, M. y Pineda, D. (2003). Procesos de elaboración de alimentos y bebidas.

Santarelli, R.; Pierre, F. y Corpet, D. (2008). Processed Meat and Colorectal Cancer: A Review of Epidemiologic and Experimental Evidence. Nutrition and Cancer, 60(2), 131-144.

Selbes, M. (2014). The Effects Of Amine Structure, Chloramine Species and Oxidation Strategies On The Formation Of N-Nitrosodimethylamine (Tesis Doctoral). Clemson University, Estados Unidos.

Sen, N. y Baddoo, P. (1997). Trends in the Levels of Residual Nitrite in Canadian Cured Meat Products over the Past 25 Years. Agric. Food Chem 45(12), (4714-4718).

Sen, N.; Donaldson, B.; Charbonneau, C. y Miles, W. (1974). Effect of Additives on the Formation of Nitrosamines in Meat Curing Mixtures Containing Spices and Nitrite. J. Agr. Food Chem 22(6), (1125-1130).

Sheng, T.; Fu, S.; Yuan, C. e Ing. (2013). Investigation of the Nitrate and Nitrite Contents in Milk and Milk Powder in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis 21(1), (73-79).

Shafiur, M. (2007). Nitrites in Food Preservation. En M. Shafiur (2.^a ed.).

Handbook of Food Preservation (299-312).

- Sierra, M. y Forman, D. (2016). Burden of colorectal cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiology*, 44S, S74-S81.
- Siu, D. y Henshall, A. (1998). Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. *Journal of Chromatography* 804. (157-160).
- Soto, M. (2016). Evaluación de la sustitución del nitrito de sodio, eritorbato de sodio y lactato de sodio por un producto comercial a base de extractos naturales, sobre las características físico químicas, microbiológicas y sensoriales de chorizo cocido (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, San José.
- Sullivan, G. (2011). Naturally cured meats: Quality, safety, and chemistry (Tesis Doctoral). Iowa State University, Estados Unidos.
- Thermo Scientific. (2013). Product Manual for Dionex IonPac AS23.
- Torres, O. (2008). Puesta a Punto de Métodos No Destructivos y de Análisis Rápidos Utilizables en el Proceso de elaboración de Jamón Curado (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Tricker, A. y Preussmann, R. (1991). Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research* 259, 277-289.
- Trujillo, E.; Fonseca, G.; García, M. y Martínez, V. (2009). Evaluación de la Cromatografía Iónica para Fomentar su Uso en la Investigación y Estudios de Posgrado en Ciencias del Agua. *Formación Universitaria* 2(1), 7-16.

- U.S. Food & Drug. (FDA). (2016). Food and Drugs Chapter I--Food and Drug Administration Department of Health and Human Services (Title 21, Volume 21).
- Vargas, S. (1996). Estudio preliminar sobre el contenido de nitrito de sodio y bases volátiles nitrogenadas y nitrosaminas volátiles en el salchichón producido por empresas embutidoras nacionales (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, San José.
- Vargas, S. y Herrera, C. (2002). Contenido de Nitrito de Sodio y Bases Volátiles Nitrogenadas Totales en el Salchichón Producido por Empresas Embutidoras Nacionales. *Ingeniería y Ciencia Química* 20 (1), 17-23.
- Vicente, D. y Pérez, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28 (2), 122-130.
- Vidal, J. (1997). Tecnología de los embutidos curados. *CYTA - Journal of Food* 1(5), 129-133.
- Vindas, L.; Rodríguez, N. y Araya, Y. (2017). Variación del contenido de nitrito de sodio residual en diferentes lotes de salchichas, de una misma formulación de una empresa productora costarricense. *Revista Pensamiento Actual* 16(27), 88-98.
- Vindas, L.; Rodríguez, N. y Araya, Y. (2019). Influencia de las características químicas y el tiempo de almacenamiento en el contenido de nitrito de sodio en salchichas elaboradas industrialmente. *RECyT* 21(31), 36-41.
- Vivanco, M. (2005). Muestreo estadístico: diseño y aplicaciones.
- Weir, A. (2009). General introduction to non-clinical toxicity testing of

pharmaceuticals, in The Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks Ltd, London. Minuto 1:50-2:45.

World Headquarters Hach Company. (2009). Fichas de Datos de Seguridad.

Young, J. (2013). Tumores en Costa Rica: Énfasis en cáncer colorrectal. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 7(1), 20-32.