	MANUAL DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PARA DETERMINAR NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER	CÓDIGO	MI-GS-MA-80
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	1 de 7


República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS CÁRNICOS DEL ÁREA FÍSICOQUÍMICO DE ALIMENTOS

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Shirley M. Cucaita	Shirley M. Cucaita	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PARA DETERMINAR NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER	CÓDIGO	MI-GS-MA-80
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	2 de 7

1. OBJETIVO

Documentar los lineamientos para la determinación del contenido de nitritos en cárnicos y derivados cárnicos bajo la metodología ISO 2918:1975.

2. ALCANCE

Este procedimiento es desarrollado por el Laboratorio Físicoquímico de Alimentos del Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander y es aplicable a la matriz de cárnicos.

3. RESPONSABILIDAD

Será responsabilidad del Coordinador del laboratorio y del profesional del Laboratorio Físicoquímico de Alimentos, aplicar lo descrito en este manual.

4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Blanco: es una solución de comparación preparada según se indica en los ensayos específicos.

Curva de calibración: es un método utilizado para determinar la concentración de una sustancia (analito) en una muestra desconocida, sobre todo en disoluciones. El método se basa en la relación proporcional entre la concentración y una determinada señal analítica (propiedad).

Espectrofotómetro UV-Vis: equipo que sirve para medir la cantidad de intensidad de luz absorbida después de pasar a través de una solución muestra.

Nitritos: El nitrato y nitrito de sodio (INS 250-251) son utilizados, principalmente, como conservadores en productos cárnicos, para inhibir el desarrollo de bacterias anaeróbicas esporuladas como *Clostridium botulinum* y además confieren el color característico de los productos curados.

Productos cárnicos procesados: Son productos elaborados a base de carne grasa vísceras y subproductos comestibles de animales de abasto autorizados para el consumo humano y adicionados o no con Ingredientes y aditivos de uso permitido y sometidos a procesos tecnológicos adecuados.


Solución estándar: es una solución que contiene una concentración conocida de un elemento o sustancia específica, llamada patrón primario.

Solución patrón: es la disolución de una sustancia utilizada como referencia al momento de hacer una valoración o estandarización.

5. CONDICIONES GENERALES

- Antes de comenzar a trabajar con las muestras, asegúrese de la limpieza de su lugar de trabajo y de que lo mencionado en materiales, insumos y reactivos esté disponible.
- Revisar el Manual del Sistema de Seguridad y Salud en el Trabajo y las hojas (fichas) de Seguridad correspondientes a los reactivos utilizados.
- Utilizar los elementos de protección personal (EPP) adecuados para la realización de la marcha analítica, (bata de laboratorio, zapatos antideslizantes, gafas protectoras y guantes de nitrilo) y registrar en el formato de verificación de uso de elementos de protección: MI-GS-RG-378
- El rango de temperatura de operación es de 20 °C – 25°C y humedad relativa máxima de 30 y 70%. Las condiciones ambientales del área donde se realiza la técnica son

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Shirley M. Cucaita	Shirley M. Cucaita	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PARA DETERMINAR NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER	CÓDIGO	MI-GS-MA-80
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	3 de 7

vigiladas a través del termohigrómetro y son registradas en el formato de condiciones ambientales Formato MI-GS-RG-37.

- Si se va a trabajar con ácidos concentrados se debe realizar en la cabina de extracción de gases y utilizar mascarilla de gases.
- Los residuos de las muestras, patrones titulados y soluciones, deben disponerse en un contenedor adecuado rotulados de acuerdo a lo establecido en el laboratorio y diligenciar el formato de entrega de residuos químicos para disposición final: MI-GS-RG-375 y manipularse correctamente según lo establecido en los protocolos de bioseguridad del laboratorio.

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Los nitritos y nitratos son frecuentemente utilizados para la conservación de embutidos. Su efecto es evitar la presencia de microorganismos, estabilizar el color y favorecer el desarrollo de aromas. En el cuerpo, el nitrato se convierte en nitrito, reconocido como un potente agente cancerígeno, especialmente de hígado, estómago, páncreas, riñones, esófago y vejiga.

Los nitritos (NO_2^-) son determinados a través de la formación de un color rojo púrpura producido a pH 2,1 a 2,5 por reacción de diazotación-copulación de la sulfanilamida con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (NED diclorhidrato). El sistema de color obedece la ley de Beer en concentraciones hasta de $180 \mu\text{g NO}_2^-$

El rango de aplicación del método para medidas espectrofotométricas es de 10 a $100 \mu\text{g NO}_2^-$ con lecturas a una longitud de onda de 543 nm si se emplea celda de 1 cm de longitud, altas concentraciones se pueden determinar por dilución.

En solución ácida los iones nitrito forman con el ácido sulfanílico una sal de diazonio que reacciona con el diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina dando un azocolorante violeta rojizo. Este colorante se determina fotométricamente.

Para la vigilancia de este parámetro, el Laboratorio de Salud Pública de Santander se basa en el procedimiento 2918:1975 de las normas ISO; este procedimiento consiste en la extracción de una porción de prueba con agua caliente, seguido a esto se realiza una precipitación de las proteínas y filtración. En presencia de nitrito, desarrollo de color rojo por adición de sulfanilamida y dihidrocloruro de N-I-naftilendiamina al filtrado y medición fotométrica a una longitud de onda de 538 nm.

7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS

Preparar la muestra de prueba inmediatamente o, si esto no se puede hacer, almacenar la muestra a una temperatura de 0 a 5 °C, por no más de 4 días.

8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA


Ver los siguientes documentos publicados en la intranet de la Gobernación de Santander.

- Manual de recepción y manejo de muestras (MI-GSM-MA-11)
- Manual de toma y recepción de muestras de alimentos y bebidas alcohólicas laboratorio de salud pública de Santander (MI-GSM-MA-08)

9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra debe ser almacenada y conservada en las condiciones que el fabricante recomiende en el empaque del alimento. Ver el siguiente documento publicado en la intranet de la Gobernación de Santander: criterios de aceptación y rechazo para la recepción de las muestras de alimentos y bebidas alcohólicas (MI-GS-RG-155)

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Shirley M. Cucaita	Shirley M. Cucaita	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PARA DETERMINAR NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER	CÓDIGO	MI-GS-MA-80
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	4 de 7

10. EQUIPOS

- Balanza analítica.
- Picadora de carne mecánica, tamaño laboratorio, provista de placa perforada con orificios no mayores de 4 mm de diámetro.
- Matraces aforados de una marca de 100 ml, 200 ml y 1000 ml, que cumplan con la norma ISO/R 1042, Clase B.
- Micropipeta de 10 ml y, en su caso, con otra capacidad según la alícuota de filtrado (8.4.1), cumpliendo con la norma ISO/R 648, Clase A
- Baño termostático
- Espectrofotómetro con celdas de 1 cm de longitud de camino óptico
- Papel de filtro acanalado, de unos 15 cm de diámetro, libre de nitrito
- Matraz cónico, 300 ml


11. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

Los reactivos deben ser de grado analítico y contar con el respectivo certificado de análisis de trazabilidad. Cuando se preparen las soluciones se debe diligenciar los formatos de Preparación de reactivos MI-GS-RG-101, Formato valoración de reactivos MI-GS-RG-107, Formato Verificación de balanza MI-GS-RG-102, Formato de verificación de agua destilada MI-GS-RG-106.

Utilice únicamente reactivos de grado analítico reconocido, a menos que se especifique lo contrario, y agua destilada o desmineralizada o agua de pureza equivalente, libre de nitritos

- **Agua libre de nitritos:** Si el agua destilada y/o desionizada no está libre de NO_2^- , utilice uno de los procedimientos siguientes para preparar agua libre de nitritos:
 1. Agregue a 1 L de agua destilada, un cristal pequeño de KMnO_4 y también de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ o $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Redestilece en un recipiente de vidrio de borosilicato y deseche los 50 ml iniciales de destilado. Recoger la fracción destilada libre de permanganato; un color rojo con reactivo DPD indica la presencia de permanganato.
 2. Agregue 1 mL de H_2SO_4 y 0,2 mL de MnSO_4 solución (36,4 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / 100 mL de agua destilada) a cada 1 L de agua destilada, y hacer un color rosa con 3 mL de solución KMnO_4 (400 mg KMnO_4 / L agua destilada). Redestilece en un recipiente de vidrio de borosilicato y deseche los 50 ml iniciales de destilado. Recoger la fracción destilada libre de permanganato; un color rojo con reactivo DPD indica la presencia de permanganato
- **Solución para la precipitación de proteínas**
 - Reactivo I: Disolver 106 g de trihidrato de ferrocianuro de potasio [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] en agua tipo I y diluir hasta 1000 ml.
 - Reactivo II: Disolver 220 g de acetato de zinc dihidrato [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] y 30 ml de ácido acético glacial en agua tipo I y diluir hasta 1000 ml.
 - Solución de bórax, saturada: Disolver 50 g de tetraborato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) en 1000 ml de agua tibia y enfriar a temperatura ambiente.
- **Solución estándar de nitrito de sodio**
 - Disolver 1000 g de nitrito de sodio (NaNO_2) en agua tipo I y diluir a 100 ml en un matraz aforado.
 - Pipetear 5 ml de la solución en un matraz aforado de 1000 ml, diluir hasta la marca, con agua tipo I.
 - Preparar una serie de soluciones estándar pipeteando 5 ml, 10 ml y 20 ml de esta solución en matraces volumétricos de 100 ml y diluyendo hasta la marca con agua tipo I (10 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L de nitritos)
- **Soluciones necesarias para el desarrollo del color**
 - Solución I: Disolver, calentando al baño maría, 2 g de sulfanilamida ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$) en 800 ml de agua. Enfriar, filtrar si es necesario y agregar 100 ml de solución concentrada de ácido clorhídrico (ρ_{20} 1,19 g/ml), mientras se agita. Diluir a 1000 ml con agua tipo I.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Shirley M. Cucaita	Shirley M. Cucaita	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PARA DETERMINAR NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER	CÓDIGO	MI-GS-MA-80
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	5 de 7

- Solución II: Disolver 0,25 g de diclorhidrato de N-I-naftiletildiamina ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \times 2HCl$) en 250 ml agua tipo I. Guardar la solución en una botella ámbar bien tapada. Se debe mantener en refrigeración, por no más de una semana.
 - Solución III: Diluir 445 ml de solución concentrada de ácido clorhídrico ($\rho_{20} 1,19$ g/ml) en 1000 ml de agua tipo I.
- **Soluciones estándar de control:**
 - Prepare un **estándar de 10 mg/L NO_2-N** , tomar 1 mL aforar a 100 mL, con agua destilada y/o desionizada.
 - Prepare un **estándar de 100 mg/L NO_2-N** , tomar 10 mL aforar a 100 mL, con agua destilada y/o desionizada.
 - Prepare un **estándar de 200 mg/L NO_2-N** , tomar 20 mL aforar a 100 mL, con agua destilada y/o desionizada.

NOTA: Patrón 1000 mg/L de NO_2 disponible comercialmente, trazable a NIST

12. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

12.1. Preparación del material y equipos

- Realizar verificación de la balanza analítica cuando sea necesario preparar las soluciones de la técnica.
- Previamente al uso de este equipo leer el instructivo de uso del espectrofotómetro y registre el uso del equipo, seleccionar una longitud de onda de 543nm.
- Rotular e identificar los erlenmeyer (limpios y secos) usados en los análisis, con el número de la muestra o código interno asignado por el laboratorio.
- Realizar una prueba en blanco usando todos los reactivos, pero omitiendo la porción de prueba, tal como se describe en el ítem 12.3.

12.2. Acondicionamiento de la muestra


- Homogenizar la muestra pasándola al menos dos veces por la picadora de carne y mezclando. Mantener la muestra en un recipiente cerrado, hermético y completamente lleno bajo refrigeración. Analizar la muestra de prueba lo antes posible, pero siempre dentro de las 24 h.
- Realizar todas las muestras por duplicado, pesar 10 g de la muestra con una precisión de 0,001 g.
- **Desprotección:**
 - Transferir cuantitativamente la porción de prueba al matraz cónico y agregar sucesivamente 5 ml de solución saturada de bórax y 100 ml de agua a una temperatura no inferior a 70 °C.
 - Calentar el matraz durante 15 minutos en el baño de agua hirviendo y agitar repetidamente.
 - Enfriar hasta temperatura ambiente el matraz y su contenido, agregar sucesivamente 2 ml de reactivo I y 2 ml de reactivo II (mezclar bien después de cada adición).
 - Transferir el contenido a un matraz volumétrico de 200 ml. Diluir hasta la marca con agua tipo I y mezclar, dejar reposar el matraz durante 30 min a temperatura ambiente.
 - Decantar cuidadosamente el líquido sobrenadante y filtrarlo a través del papel de filtro acanalado para obtener una solución clara.

12.3. Análisis de la muestra

Medición del color

- Pipetear una alícuota del filtrado (V ml), pero no más de 25 ml, en un matraz volumétrico de 100 ml y agregar agua para obtener un volumen de aproximadamente 60 ml.
- Añadir 10 ml de solución I, seguidos de 6 ml de solución III, mezclar y dejar la solución durante 5 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.
- Agregar 2 ml de solución II, mezclar y dejar la solución de 3 a 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Diluir hasta la marca con agua.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Shirley M. Cucaita	Shirley M. Cucaita	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PARA DETERMINAR NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER	CÓDIGO	MI-GS-MA-80
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	6 de 7

- Medir la absorbancia de la solución en una celda de 1 cm utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de aproximadamente 538 nm.

Nota: Si la absorbancia de la solución coloreada obtenida de la porción de prueba excede la obtenida para la solución estándar con la mayor concentración, repetir las operaciones descritas anteriormente reduciendo la cantidad de filtrado pipeteado en el primer ítem de la medición del color.

Curva de calibración

- Pipetear respectivamente en cuatro matraces volumétricos de 100 ml, 10 ml de agua y 10 ml de cada una de las tres soluciones patrón de nitrito de sodio que contengan 10 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L de nitritos
- A cada matraz agregar agua hasta obtener un volumen de aproximadamente 60 ml y proceder como se describe en la medición del color.
- Realizar la curva de calibración trazando las absorbancias medidas contra las concentraciones, en microgramos por mililitro de las soluciones estándar.

NOTA: La curva de calibración realizada se debe grabar en el equipo. Se debe verificar la curva periódicamente. En el caso que las soluciones de control no arrojen el valor deseado y se realicen las debidas verificaciones, se debe construir la curva nuevamente como se indicó anteriormente.

12. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO

- Realizar control con blanco de agua destilada, previo a cada montaje
- Ejecute la rutina de verificación del equipo espectrofotómetro según cronograma del laboratorio (una vez a la semana).
- Utilice siempre material limpio, siguiendo el ítem lavado de material en el Instructivo de limpieza y desinfección del laboratorio
- Analizar una solución estándar de control semanalmente. Verificar el resultado en la carta de control del método y debe encontrarse en los límites de control/alarma. La solución estándar de control 0,05-0,1-0,2 mg/L NO₂-N; De esta manera se revisa la curva de calibración del método. El coeficiente de correlación de la curva de calibración debe ser ≥ 0.995 .
- Diligenciar el formato de captura de datos del método registrando todas las casillas que se indiquen.
- Se debe participar en Programa Interlaboratorio del instituto Nacional de Medicamentos y Alimentos (INVIMA)
- En caso de que los criterios mencionados no cumplan (la diferencia porcentual relativa, verificación del equipo), se debe parar el análisis y seguir el procedimiento de trabajo no conforme.

13. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Calcular el contenido de nitrito de la muestra, expresado como miligramos de nitrito de sodio por kilogramo, utilizando la fórmula:


$$\text{Nitrito (mg/kg)} = \frac{C \times 2000}{m \times V}$$

C = concentración de nitrito de sodio

m = masa en gramos de la porción de ensayo

V = volumen en mililitros, de la alícuota del filtrado tomada para la determinación fotométrica

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Shirley M. Cucaita	Shirley M. Cucaita	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PARA DETERMINAR NITRITOS EN CÁRNICOS Y DERIVADOS LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER	CÓDIGO	MI-GS-MA-80
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	7 de 7

14. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS

Los resultados serán enviados por correo electrónico al técnico remitente de la muestra y a coordinación de Salud ambiental, con los requisitos mínimos requeridos por la ISO17025

15. EXAMENES COMPLEMENTARIOS

No aplica

16. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

INTERNATIONAL STANDARD. ISO 2018:1975, Meat and meat products - Determination of nitrite content (Reference method). 1st Ed., 1975.

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCION SOCIAL. Resolución 4125 de 1991. Por la cual se reglamenta el Título V Alimentos, de la Ley 09 de 1979, en lo concerniente a los CONSERVANTES utilizados en alimentos. Bogotá D.C.: El Ministerio, 1991. 3 p.

17. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Los controles no deben estar por fuera de los rangos de aceptación establecidos en la carta control de nitritos, tanto para los rangos alto, medio y bajo rango, en caso de presentarse desviación, se procede a realizar Trabajo NO Conforme y a repetir el análisis.

18. ANEXOS

- Hoja de verificación del espectrofotómetro
- Hoja de trabajo de cárnicos

19. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	28/06/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Shirley M. Cucaita	Shirley M. Cucaita	Alejandra Galvis Vargas