

## 1 OBJETO

Esta Norma Venezolana contempla los métodos de ensayos para la determinación del contenido de nitratos y nitritos en carne y productos cárnicos.

## 2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Esta Norma es completa.

## 3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Venezolana COVENIN se aplican las siguientes definiciones:

**3.1 Contenido de nitratos en carnes y productos cárnicos:** Es la cantidad de nitrato contenida en la muestra, determinado según los procedimientos descritos en esta norma y expresados como miligramos de nitrato de sodio por kilogramo (ppm).

**3.2 Contenido de nitritos en carnes y productos cárnicos:** Es la cantidad de nitrito contenida en la muestra, determinada según los procedimientos descritos en esta norma y expresada como miligramos de nitrito de sodio por kilogramos (ppm).

**3.3 Contenido de nitritos totales en carnes y productos cárnicos:** Es la cantidad de nitritos totales (nitritos más nitratos) contenida en la muestra, determinada según los procedimientos descritos en esta norma y expresada como miligramos de nitrito de sodio por kilogramos (ppm).

## 4 MÉTODOS DE ENSAYOS

### 4.1 Método colorimétrico (Método 1)

#### 4.1.1 Principio

Este método se basa en la extracción de la muestra de ensayo con agua caliente, precipitación de las proteínas y filtración; reducción de los nitratos a nitritos con cadmio metálico; desarrollo de color rojo por la adición sulfanilamida y bicloruro N-1-naftiletildiamina y lectura a una longitud de onda de 538 nm.

#### 4.1.2 Aparatos y materiales

4.1.2.1 Balanza analítica.

4.1.2.2 Baño agua con regulador de temperatura.

4.1.2.3 Colorímetro fotoeléctrico o espectrofotómetro provisto de celdas de 1 cm.

4.1.2.4 Equipo de vidrio para la reducción de nitratos (Ver figura N° 1).

4.1.2.5 Fiola de 300 ml.

4.1.2.6 Matraces aforados de 100, 200 y 1000 ml. Debe cumplir con lo establecido en el reporte ISO/R 1042, Clase "B".

4.1.2.7 Molino de carne de placas perforadas con orificios no mayor de 4 mm de diámetro.

**4.1.2.8** Pipetas volumétricas de 10 ml, 20 ml u otras capacidades si son necesarias, de acuerdo a la alícuota de filtrado. Las pipetas deben cumplir con lo establecido en el reporte ISO/R 648, Clase "A".

**4.1.2.9** Papel de filtro, de diámetro 15 cm y libre de nitrito y nitrato.

### **4.1.3 Reactivos / Soluciones**

Todos los reactivos deben ser de grado analítico y el agua, a menos que se especifique lo contrario, debe ser destilada o de pureza equivalente.

#### **4.1.3.1 Reactivos / Soluciones para la precipitación de las proteínas**

**4.1.3.1.1** Ferrocianuro de potasio trihidratado ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ): Disolver 106 g de ferrocianuro de potasio trihidratado en agua y llevar a volumen en matraz aforado de 1000 ml.

**4.1.3.1.2** Acetato de zinc dihidratado ( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ): Disolver 220 g de acetato de zinc dihidratado y 30 ml de ácido acético glacial en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

**4.1.3.1.3** Acido acético glacial ( $CH_3COOH$ ).

**4.1.3.1.4** Tetraborato disódico decahidratado ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ ). (Bórax): Disolver 50 g de tetraborato disódico decahidratado en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

#### **4.1.3.2 Reactivos/soluciones para la preparación de la columna de cadmio**

**4.1.3.2.1** Zinc en barras, longitud aproximada de 15 cm y diámetro entre 5 a 7 mm.

**4.1.3.2.2** Solución de sulfato de cadmio, 30 g/100 ml ( $CdSO_4 \cdot 8H_2O$ ). Disolver 30 g de sulfato de cadmio en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 100 ml.

**4.1.3.2.3** Ácido clorhídrico concentrado (HCl) ( $d_{20}=1,19g/ml$ ).

**4.1.3.2.4** Solución de ácido clorhídrico, 0,1 N. Diluir 8 ml. de ácido clorhídrico concentrado y llevar a volumen con agua en un matraz aforado de 1000 ml.

**4.1.3.2.5** Sal sódica dihidratada del ácido etilendiamino tetracético,  $[CH_2N(CH_2COOH)CH_2COONa]_2 \cdot 2H_2O$ .

**4.1.3.2.6** Hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ), ( $d_{20} = 0,88 g/ml$ ).

**4.1.3.2.7** Solución buffer alcalina, pH 9,6 - 9,7: Diluir 20 ml de ácido clorhídrico concentrado en 500 ml de agua. Luego de mezclar, añadir 10 g de EDTA y 55 ml de solución de amonio concentrada. Diluir hasta 1000 ml con agua y mezclar. Chequear el pH

**4.1.3.2.8** Solución estándar de nitrato de potasio. Disolver 1,465 g de nitrato de potasio en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml. Transferir con pipeta 5 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua. Esta solución contiene 73,25  $\mu g/ml$  de nitrato de potasio y debe ser preparada el día de uso.

#### **4.1.3.3 Soluciones para el desarrollo de color preparación de curva patrón**

**4.1.3.3.1** Solución 1. Disolver, por calentamiento, 2 g de sulfanilamida ( $NH_2C_6H_4SO_2NH_2$ ) en 800 ml de agua. Enfriar, filtrar (si es necesario), mantener en agitación constante y adicionar 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a volumen con agua a un matraz aforado de 1000 ml.

**4.1.3.3.2** Solución 2. Disolver 0,25 g de bicloruro N-1 Naftiletildiamina ( $C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$ ) con agua. Llevar a volumen en un matraz aforado de 250 ml. Esta solución debe ser mantenida a temperatura de refrigeración y en envase de color ámbar por un tiempo máximo de una semana.

**4.1.3.3.3** Solución 3: Diluir 445 ml de ácido clorhídrico concentrado con agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

**4.1.3.3.4** Solución de madre de nitrito de sodio. Disolver 1,00 g (uno) de nitrito de sodio en agua y llevar a

volumen en un balón aforado de 1000 ml.

**4.1.3.3.5** Solución trabajo (0,005 g/l de nitrito de sodio): Transfiera con pipeta, 5 ml de la solución madre a un matraz volumétrico aforado de 1000 ml. Llevar a volumen con agua.

**NOTA 1:** Las soluciones deben ser preparadas el mismo día de su uso.

#### **4.1.4 Muestra**

**4.1.4.1** Obtener una muestra representativa no menor a 200 g.

**4.1.4.2** Preparar la muestra para ensayo (Véase el numeral 4.1.5.1) inmediatamente o, si esto no se puede hacer, almacenar la muestra a una temperatura de 5 °C, por no más de 4 días.

#### **4.1.5 Procedimiento**

##### **4.1.5.1 Preparación y conservación de la muestra**

Homogeneizar la muestra, haciéndola pasar al menos dos veces a través de un molino de carne y luego mezclar. Llenar completamente el recipiente de cierre hermético y almacenar bajo refrigeración. Analizar tan pronto como sea posible, pero siempre dentro de un lapso de 24 horas.

**NOTA 2:** En el caso de productos crudos, se analiza inmediatamente después de homogeneizar.

#### **4.1.6 Preparación, pretratamiento y chequeo de la capacidad reductora de la columna de cadmio**

##### **4.1.6.1 Preparación de la columna de cadmio**

**4.1.6.1.1** Colocar 2 a 3 barras de zinc en la solución de sulfato de cadmio contenida en un vaso de precipitado (un litro de solución es suficiente para preparar una columna de cadmio).

**4.1.6.1.2** Remover cada una o dos horas el depósito esponjoso del cadmio metálico formado en las barras de zinc, mediante giro de las barras en la solución o por frotamiento de unas contra otras.

**4.1.6.1.3** Dejar reposar por 6 a 8 horas, decantar la solución y lavar el depósito dos veces con un litro de agua, teniendo cuidado de que el cadmio esté continuamente cubierto con una capa de líquido.

**4.1.6.1.4** Transferir el depósito de cadmio a una licuadora y añadir 400 ml de solución de ácido clorhídrico (4.1.3.2.4) y mezclar por 10 segundos. Retornar el contenido de la licuadora al beaker.

**4.1.6.1.5** Agitar ocasionalmente el depósito de cadmio con una varilla de vidrio. Después de dejar este depósito por una noche inmerso en solución de ácido clorhídrico, agitar una vez más y remover todas las burbujas de gas del depósito de cadmio.

**4.1.6.1.5** Decantar la solución y lavar dos veces el depósito de cadmio, utilizando un litro de agua por vez.

**4.1.6.1.6** Colocar lana de vidrio en la base de la columna a ser utilizada (véase figura 1).

**4.1.6.1.7** Introducir con ayuda de agua, el cadmio en la columna hasta una altura no menor de 17 cm. Drenar la columna ocasionalmente durante su llenado, teniendo el cuidado que el nivel del líquido no caiga por debajo del tope de la columna de cadmio. Eliminar las inclusiones de gas (con una varilla metálica, por ejemplo). El líquido debe fluir a una velocidad que no exceda los 3 ml / min.

##### **4.1.6.2 Pre-tratamiento de la columna de cadmio.**

Lavar sucesivamente la columna de cadmio con 25 ml de la solución de ácido clorhídrico 0,1 N, 50 ml de agua y 25 ml de solución buffer alcalina, diluida en 1 + 9. Evitar que el nivel del líquido baje hasta el final del embudo.

##### **4.1.6.3 Chequeo de la capacidad reductora de la columna de cadmio**

**4.1.6.3.1** Transferir con pipeta al embudo de la columna 20 ml de solución estándar de nitrato de potasio y



simultáneamente adicionar 5 ml de la solución buffer alcalina. Recoger el fluido en un matraz volumétrico aforado de 100 ml.

**4.1.6.3.2** Lavar las paredes con aproximadamente 15 ml de agua, cuando el embudo de la columna esté cercano a vaciarse. Repetir nuevamente el lavado con otros 15 ml de agua. Después de haber fluido totalmente el último lavado por la columna, llenar completamente el embudo con agua.

**4.1.6.3.3** Retirar el matraz colocado debajo de la columna cuando el fluido recolectado esté cercano a 100 ml. Llevar a volumen (100 ml) con agua.

**4.1.6.3.4** Proceder a la medición de color como se indica en el apartado 4.1.10.

**NOTA 3:** En el caso de que la concentración de nitritos sea menor a 0,9 µg nitrito de sodio por mililitro (es decir 90 % del valor teórico), la columna de cadmio debe ser tratada nuevamente.

#### **4.1.7 Desproteización**

**4.1.7.1** Pesar, con apreciación de 0,001 g., 10 g de la muestra preparada.

**4.1.7.2** Transferir cuantitativamente la muestra de ensayo al erlenmeyer cónico y añadir sucesivamente 5 ml de solución saturada de tetraborato y 100 ml de agua a una temperatura no menor de 70°C.

**4.1.7.3** Calentar el contenido del erlenmeyer en un baño de agua hirviendo por 15 minutos., agitando con frecuencia.

**4.1.7.4** Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir sucesivamente 2 ml de la solución ferrocianuro de potasio y 2 ml de la solución acetato de zinc. Mezclar completamente después de cada adición.

**4.1.7.5** Transferir el contenido al matraz volumétrico aforado de 200 ml. Llevar a volumen con agua y mezclar. Dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

**4.1.7.6** Decantar cuidadosamente el sobrenadante y filtrar a través de papel de filtro a fin de obtener una solución clara.

#### **4.1.8 Determinación de nitritos**

Transferir por medio de una pipeta volumétrica una alícuota no mayor de 25 ml del filtrado a un balón de 100 ml que contenga 10 ml aproximadamente de agua. Proceder a medir el color tal como se indica en el apartado 4.1.10.

#### **4.1.9 Determinación de nitratos**

Para determinar el contenido de nitratos en la muestra se procede a realizar la reducción de nitratos a nitritos según se indica a continuación.

**4.1.9.1** Transferir con pipeta al embudo de la columna de cadmio 20 ml del filtrado (4.1.7.6) y simultáneamente adicionar 5 ml de solución buffer alcalina.

**4.1.9.2** Recolectar el fluido desde la columna a un matraz volumétrico aforado de 100 ml. Cuando el embudo de la columna esté cercano a vaciarse, lavar las paredes con aproximadamente 15 ml de agua, repetir nuevamente el lavado con otros 15 ml de agua.

**4.1.9.3** Retirar el matraz volumétrico colocado debajo de la columna cuando el fluido recolectado está cercano a 100 ml. Llevar a volumen con agua.

**4.1.9.4** Proceder a la medición de color como se indica en el apartado 4.1.10.

#### **4.1.10 Medición del color**

**4.1.10.1** Transferir con una pipeta una alícuota del filtrado, máximo 25 ml, a un matraz volumétrico aforado de 100 ml y agregar agua para obtener un volumen aproximadamente de 60 ml.

**4.1.10.2** Añadir 10 ml de la solución 1 (Sulfanilamida), seguida por 6 ml de la solución 3 (Solución de ácido clorhídrico), mezclar y dejar la solución por 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

**4.1.10.3** Añadir 2 ml de solución 2 (Naftilendiamina), mezclar y dejar la solución de 3 a 10 min. en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego llevar a volumen con agua.

**4.1.10.4** Se debe preparar un blanco en las mismas condiciones de ensayo que la muestra.

**4.1.10.5** Medir la absorbancia de la solución en una celda de 1 cm usando un colorímetro fotoeléctrico o espectrofotómetro, a una longitud de onda de 538 nm.

**NOTA 4:** Si la absorbancia de la solución coloreada obtenida de la porción de ensayo excede a la obtenida para la solución estándar con la concentración más alta, se repite la operación como se describe en el apartado 4.1.9, utilizando una alícuota menor.

#### **4.1.11 Número de determinaciones**

Esta determinación debe realizarse por duplicado, utilizando dos porciones de 10 gramos, tomadas a partir de la misma muestra de ensayo.

Se debe realizar una determinación del blanco

##### **4.1.11.1 Curva de calibración**

**a)** Preparar una serie de soluciones estándar transfiriendo con pipeta volumétrica de 5 ml, 10 ml, y 20 ml de la solución madre (4.1.3.3.5) a matraces aforados de 100 ml, llevar a volumen con agua. Estas soluciones estándar contienen 0,25 µg; 0,50 µg y 1,00 µg de nitrito de sodio por mililitro.

**b)** Transferir con pipetas a tres matraces aforados de 100 ml, 10 ml de agua y 10 ml de cada una de las tres soluciones estándar de nitrito preparadas en a). Preparar un blanco.

**c)** Proceder a realizar la medición como se indica en 4.1.10.

**d)** Construir la curva de calibración graficando las mediciones de absorbancia contra la concentración en microgramos por mililitro (µ/ml), de las soluciones estándar de nitrito de sodio.

**NOTA 5:** Cuando se requiera aumentar la sensibilidad del método, se recomienda utilizar alícuotas diferentes a las indicadas en el punto a).

#### **4.1.12 Expresión de los resultados**

**4.1.13** El contenido de nitritos en la muestra, expresado en mg de  $\text{NaNO}_2$ /kg de muestra, se calcula como sigue:

$$(\text{mg/kg}) \text{NaNO}_2 = \left[ \frac{C \times A}{m \times V} \right]$$

Donde:

m= Masa en gramos de la porción ensayada

V= Volumen en mililitro de la alícuota de filtrado (4.1.10.1) tomada para la determinación de color.

C= Concentración de nitrito de sodio en µg /ml, leído en la curva de calibración.

A = Factor de dilución / Factor de conversión (A = 20000 cuando se utilizan los valores indicados en este método)

**4.1.13.1** El contenido de nitrato en la muestra, expresado como miligramo de nitrito de sodio por kilogramo, se calcula como sigue:

$$(\text{mg/kg}) \text{NaNO}_3 = 1,231 \left[ C \times \frac{B}{m \times V} - \text{NaNO}_2 \right]$$

Donde:

$m$  = Masa en gramos de la porción ensayada

$V_1$  = Volumen en mililitro de la alícuota del filtrado (4.1.10.1) tomada para la determinación de color.

$C$  = Concentración de nitrito de sodio en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , tomada en la curva patrón, leído en la curva de calibración.

$\text{NaNO}_2$  = Es el contenido de nitrito de la muestra, expresado como miligramo de nitrito de sodio por kilogramo.

$B$  = Factor de dilución / Factor de conversión ( $B = 100000$  cuando se utilizan los valores indicados en este método)

$1,231$  = Factor estequiométrico de conversión de nitrito de potasio a nitrato de potasio

Se toma como resultado el promedio aritmético de las dos determinaciones, con tal que el requerimiento de repetibilidad sea satisfecho. Se expresa el resultado con aproximación a 1 mg/Kg de producto

#### 4.1.14 Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones llevadas a cabo simultáneamente o en sucesión rápida por el mismo analista no debe ser mayor de 10 % del promedio.

#### 4.1.15 Informe

El informe debe contener lo siguiente:

4.1.15.1 Fecha de realización del ensayo

4.1.15.2 Identificación completa de la muestra

4.1.15.3 Resultado del análisis realizado

4.1.15.4 Número y título de la Norma Venezolana COVENIN consultada

4.1.15.5 Nombre del analista

4.1.15.6 Observaciones

### 4.2 Método Colorimétrico (Método 2)

#### 4.2.1 Principio

Este método se basa en la extracción de la muestra de ensayo con agua caliente, precipitación de las proteínas y filtración; reducción de los nitratos a nitritos con cadmio metálico; desarrollo de color rojo por la adición de alfa-naftol y determinación colorimétrica a una longitud de onda de 474 nm.

#### 4.2.2 Aparatos y materiales

4.2.2.1 Molino de carne.

4.2.2.2 Balanza analítica.

4.2.2.3 Baño de agua con regulador de temperatura

4.2.2.4 Espectrofotómetro provisto de celdas de 1 cm.

- 4.2.2.5 Equipo para la reducción de nitratos (Ver figura N° 2)
- 4.2.2.6 Matraces aforados de 25 ml, 100 ml y 1000 ml.
- 4.2.2.7 Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 20 ml.
- 4.2.2.8 Papel de filtro, libre de nitrito y nitrato
- 4.2.2.9 Embudo de separación de 125 ml
- 4.2.2.10 Vasos de precipitado 50 y 1000 ml.
- 4.2.2.11 Embudos de filtración
- 4.2.2.12 Varillas de vidrio

#### 4.2.3 Reactivos / Soluciones

Todos los reactivos deben ser de grado analítico y el agua, a menos que se especifique lo contrario debe ser destilada o de pureza equivalente.

##### 4.2.3.1 Soluciones para la precipitación de las proteínas

4.2.3.1.1 Solución de Ferrocianuro de potasio trihidratado [ $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ]: Disolver 106 g de ferrocianuro de potasio trihidratado en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

4.2.3.1.2 Solución de acetato de zinc dihidratado [ $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ]: Disolver 220 g de acetato de zinc dihidratado y 30 ml de ácido acético glacial en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

4.2.3.1.3 Solución saturada de bórax. Disolver 50 g de tetraborato disódico decahidratado ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml.

##### 4.2.3.2 Solución para preparar la columna

4.2.3.2.1 Solución de sulfato de cadmio, 30 g/100 ml ( $CdSO_4 \cdot 8H_2O$ ). Disolver 30 g de sulfato de cadmio en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 100 ml.

4.2.3.2.2 Solución de ácido clorhídrico, 0,1 N. Diluir 8 ml. de ácido clorhídrico concentrado y llevar a volumen con agua en un matraz aforado de 1000 ml.

4.2.3.2.3 Solución buffer alcalina, pH 9,6 - 9,7: Diluir 20 ml de ácido clorhídrico concentrado en 500 ml de agua. Luego de mezclar, añadir 10 g de EDTA y 55 ml de solución de amonio concentrada. Diluir hasta 1000 ml con agua y mezclar. Chequear el pH

4.2.3.2.4 Solución estándar de nitrato de potasio. Disolver 1,465 g de nitrato de potasio en agua y llevar a volumen en un matraz aforado de 1000 ml. Transferir 5 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua. Esta solución contiene 73,25  $\mu g$ / ml de nitrato de potasio.

##### 4.2.3.3 Solución para desarrollo del color

Solución de alfa-naftol ( $C_{10}H_8O$ ): Calentar 360 ml de agua y 50 ml de ácido acético a 50 °C, transferir a un frasco ámbar que contenga 0,25 g de ácido sulfanílico, disolver., adicionar 0,2 g de alfa-naftol y agitar. Enfriar a temperatura ambiente, adicionar 90 ml de solución de hidróxido de amonio al 10% (v/v). El pH de esta solución debe ser  $4 \pm 0,5$ .

##### 4.2.3.4 Soluciones para la preparación de la curva patrón

Solución estándar de nitrito de sodio: Disolver 0,200 g de nitrito de sodio en agua y llevar a volumen en un balón aforado de 1000 ml. Transferir 5 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua (1 ml = 10  $\mu g$  de nitrito de sodio).

#### 4.2.4 Muestra



**4.2.4.1** Obtener una muestra representativa no menor a 200 g.

**4.2.4.2** Preparar la muestra para ensayo (Véase el numeral 4.2.5.1) inmediatamente o, si esto no se puede hacer, almacenar la muestra a una temperatura de 5 °C, por no más de 4 días.

#### **4.2.5 Procedimiento**

##### **4.2.5.1 Preparación y conservación de la muestra**

Homogeneizar la muestra, haciéndola pasar al menos dos veces a través de un molino de carne y luego mezclar. Llenar completamente el recipiente de cierre hermético y almacenar bajo refrigeración. Analizar tan pronto como sea posible, pero siempre dentro de un lapso de 24 horas.

**NOTA 6:** En el caso de productos crudos, se analiza inmediatamente después de homogeneizar.

##### **4.2.6 Preparación, pretratamiento y chequeo de la capacidad reductora de la columna de cadmio**

###### **4.2.6.1 Preparación de la columna**

**4.2.6.1.1** Colocar 2 a 3 barras de zinc en un vaso de precipitado de 1000 ml con aproximadamente 250 ml de sulfato de cadmio al 30 %, dejar en reposo hasta la formación de un depósito de cadmio esponjoso.

**4.2.6.1.2** Remover este depósito cada una o dos horas con ayuda de una varilla de vidrio, dejar en reposo toda la noche.

**4.2.6.1.3** Decantar la solución y lavar el depósito con agua, teniendo cuidado que el cadmio esté continuamente cubierto con una capa de agua.

**4.2.6.1.4** Transferir el cadmio formado a una licuadora y añadir aproximadamente 200 ml de agua y triturar por 30 segundos ó hasta obtener un tamaño de partículas homogéneas y finas.

**4.2.6.1.5** Colocar en la parte más baja de la columna, lana de vidrio y arena lavada  $\pm$  1 cm (figura 2). Con ayuda de agua y varilla de vidrio introducir el cadmio triturado hasta una altura no menor de 12 cm. Drenar la columna ocasionalmente durante su llenado, teniendo el cuidado que el nivel del líquido no caiga del tope del lecho de cadmio evitando las inclusiones del gas.

**NOTA 7:** No se debe dejar el cadmio esponjoso sin recubrir con agua.

**4.2.6.1.6** Adaptar un embudo de separación de 125 ml a la columna por medio de un tapón de goma (figura N° 2) y prevenir que no entre aire a la columna, manteniéndola siempre con agua.

###### **4.2.6.2 Pretratamiento de la columna de cadmio**

Previo a cualquier determinación a través de la columna de cadmio, ésta se debe lavar sucesivamente con 25 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, 50 ml de agua y finalmente con 25 ml de la solución buffer.

###### **4.2.6.3 Chequeo de la capacidad reductora de la columna de cadmio.**

**4.2.6.3.1** Verificar la capacidad reductora de la columna de cadmio pasando a través de la columna 10 ml de la solución estándar de nitrato de potasio más 5 ml de la solución buffer, (según punto 4.2.9) recogiendo el fluido en un matraz aforado de 100 ml. Completar la dilución con agua, a través de la columna de cadmio.

**4.2.6.3.2** Transferir 10 ml a un matraz aforado de 25 ml, desarrollar color y leer en el espectrofotometro. Si la concentración de nitritos del fluido recolectado está por debajo del 90 % del valor teórico, el cadmio de la columna debe ser pretratado nuevamente.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Valor encontrado}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

##### **4.2.7 Desproteínización**

**4.2.7.1** Pesar de la muestra preparada 10 g con una apreciación de 0,001 g



**4.2.7.2** Transferir cuantitativamente la muestra de ensayo con ayuda de una varilla de vidrio y  $\pm$  40 ml de agua caliente a un matraz aforado de 100 ml, añadir 5 ml de solución de Borax, mezclar.

**4.2.7.3** Calentar el matraz en un baño de agua hirviendo por 15 minutos, agitando con frecuencia.

**4.2.7.4** Enfriar a temperatura ambiente y añadir sucesivamente 2 ml de solución de ferrocianuro de potasio y 2 ml de solución acetato de zinc, agitando después de cada adición.

**4.2.7.5** Llevar a volumen con agua y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

**4.2.7.6** Decantar cuidadosamente y filtrar con papel de filtro libre de nitritos y nitratos.

#### **4.2.8 Preparación de la curva de calibración**

**4.2.8.1** Preparar una serie de soluciones partiendo de la solución estándar de nitrito de sodio, transfiriendo alícuotas que van desde 0,25 ml a 10 ml en matraces aforados de 25 ml.

**4.2.8.2** Adicionar a cada uno 5 ml de la solución buffer y 10 ml de la solución de alfa-naftol para desarrollar color. llevar a volumen con agua.

**4.2.8.3** Colocar los matraces en baño de agua a  $25 \pm 5$  °C durante 30 minutos para desarrollar color.

**4.2.8.4** Leer la absorbancia de las soluciones contra un blanco de reactivos en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 474 nm en celdas de 1 cm.

**4.2.8.5** Construir la curva patrón graficando la medida de la absorbancia (X) contra la concentración expresada en  $\mu\text{g/ml}$  de nitrito de sodio (Y)

**NOTA 8:** Cuando se requiera aumentar la sensibilidad del método, se recomienda utilizar alícuotas diferentes a las indicadas en este punto.

#### **4.2.9 Determinación de nitritos**

**4.2.9.1** Transferir por medio de una pipeta volumétrica a un matraz aforado de 25 ml una alícuota de 10 ml del filtrado desproteinizado (4.2.7.6).

**4.2.9.2** Añadir 5 ml de la solución buffer, mezclar y 10 ml de la solución de alfa-naftol; llevar a volumen con agua, agitar y colocar el matraz en un baño de agua a  $25 \pm 5$  °C durante 30 minutos.

**4.2.9.3** Leer la absorbancia utilizando un fotocolorímetro a una longitud de onda de 474 nm en una celda de 1 cm.

#### **4.2.10 Determinación de nitratos**

**4.2.10.1** Para la reducción de nitratos a nitritos, transferir a un vaso de precipitado de 50 ml. con pipeta volumétrica 20 ml del filtrado desproteinizado (4.2.6.6)

**4.2.10.2** Añadir 5 ml de la solución buffer y 1 ml de la solución de EDTA al 6,5 % (en caso de que la solución buffer no la contenga)

**4.2.10.3** Mantener el pH de la columna alcalino entre 9 - 10, pasar  $\pm$  20 ml de la solución buffer antes de transferir cada filtrado para mantener el pH de la misma.

**4.2.10.4** Colocar la solución preparada en el embudo de separación para hacerla pasar por la columna a una velocidad de 5 ml/min.

**4.2.10.5** Pasar agua a través de la columna hasta recoger 100 ml en un matraz aforado (descartar los primeros 10 ml que fluyen por la columna), llevar a volumen.

**4.2.10.6** Proceder a realizar la medición de color como se indica en el punto 4.1.11.

**NOTA 9:** No permita que el cadmio se seque.

#### 4.2.11 Medición de color

4.2.11.1 Transferir cuantitativamente 10 ml del fluido a un matraz aforado de 25 ml.

4.2.11.2 Añadir 5 ml de la solución buffer y 10 ml de la solución de alfa-naftol para desarrollar color.

4.2.11.3 Leer la absorbancia en un fotolorímetro a una longitud de onda de 474 nm en celdas de un cm.

#### 4.2.12 Número de determinaciones

Realizar dos determinaciones independientes, comenzando por diferentes porciones de ensayo tomadas de la misma muestra a analizar. Se debe hacer un blanco de reactivos.

#### 4.2.13 Expresión de los resultados

4.2.13.1 El contenido de nitritos en la muestra, expresado en mg de  $\text{NaNO}_2/\text{kg}$  de muestra, se calcula como sigue:

$$(A1) \quad \text{NaNO}_2(\text{mg/kg}) = \frac{C \times 2.500}{M(\text{g}) \times V}$$

Donde:

C = Concentración (mcg/ml), leído en la curva de calibración

V = Volumen en mililitro de la alícuota del filtrado

M = Masa de la muestra en gramos.

4.2.13.2 El contenido de nitritos totales ( nitritos + nitratos) en la muestra, expresado en miligramos de nitrato de sodio por Kg, se calcula:

$$(A2) \quad (\text{mg/kg}) \text{ NaNO}_2 \text{ Total} = \frac{C \times 12.500}{M(\text{g}) \times V}$$

4.2.13.3 El contenido de nitratos en la muestra se expresa en miligramos de nitrato de sodio por kilogramo y se calcula:

$$(\text{mg/kg}) \text{ NaNO}_3 = (A2 - A1) \times 1,231$$

Donde:

(A1) = Contenido de nitritos de sodio en la muestra (mg/kg)

(A2) = Contenido de nitritos totales ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) en la muestra (mg/Kg)

1,231= factor de conversión de nitrito de sodio a nitrato de sodio.

#### 4.2.14 Informe

Véase el punto 4.1.14

### BIBLIOGRAFÍA

AOAC Association of Official Analytical Chemical. Official Methods of Analysis 1995. 16<sup>th</sup> Ed.. USA

American meat Institute S/F Laboratory methods of the meat industry. Chicago, Illinios.

ISO 2918 - 1975. Meat and meat products. Determination of nitrite content.

ISO 3091 - 1975. Meat and meat products. Determination of nitrate content.

ISO 648 - 1997. Laboratory glassware. One-mark pipettes

ISO 1042 - 1998. Laboratory glassware. One-mark volumetric flasks

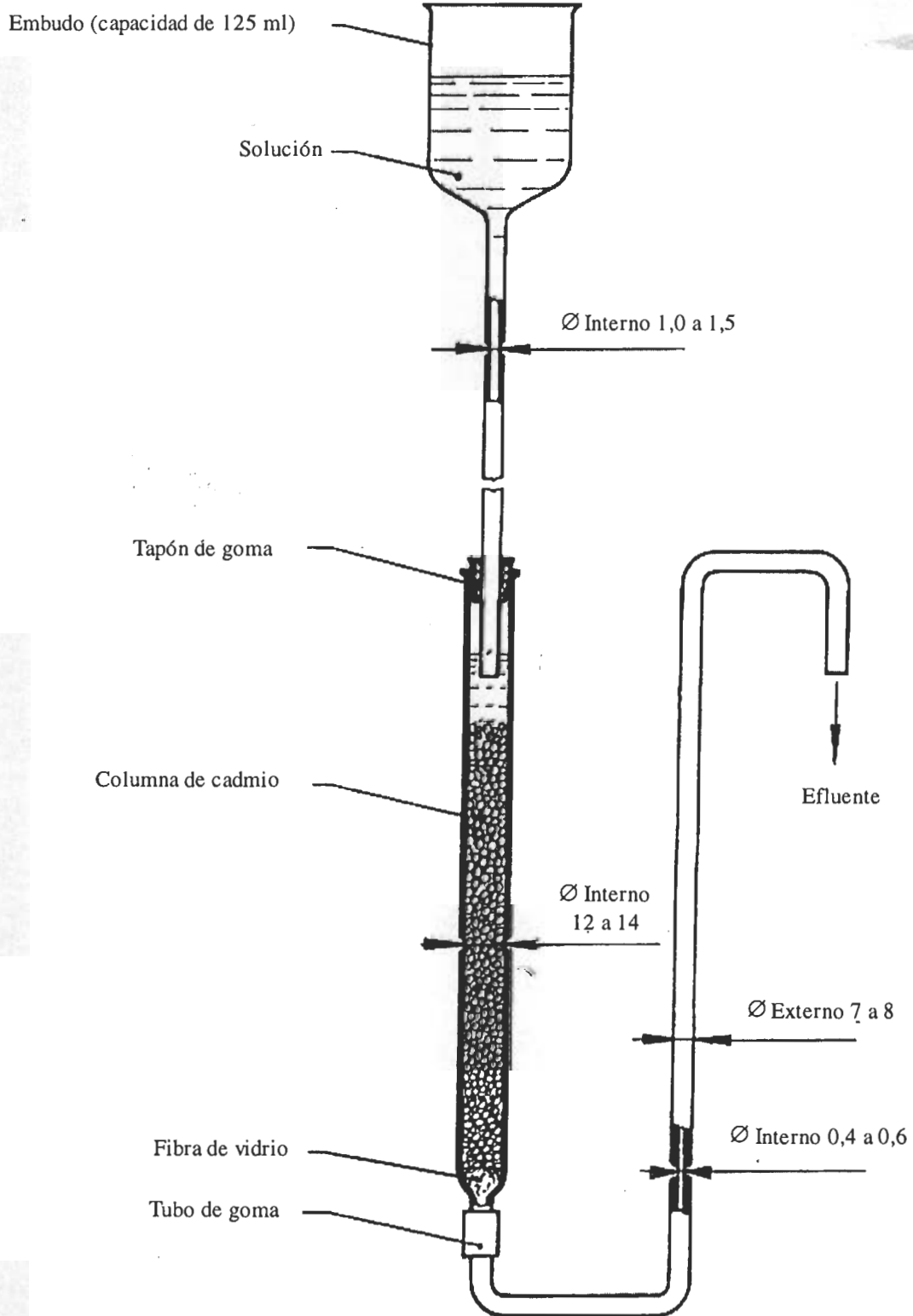
Métodos de análisis de la industria charcutera. Centro técnico de la salazón, charcutería y conserva de carne. París. Edit. Acribia 1974

Normas Analíticas del Instituto Adolfo Lutz. N° 535 Determinación de nitrito. pag. 81. 1976

Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" pag. 21 - 24. 1.985.



Dimensiones en milímetros



**NOTA:** Una conexión flexible puede ser utilizada entre la base de la columna y el tubo capilar efluente, en el orden de ajustar la altura del tubo capilar y así al velocidad del flujo.

Figura 1

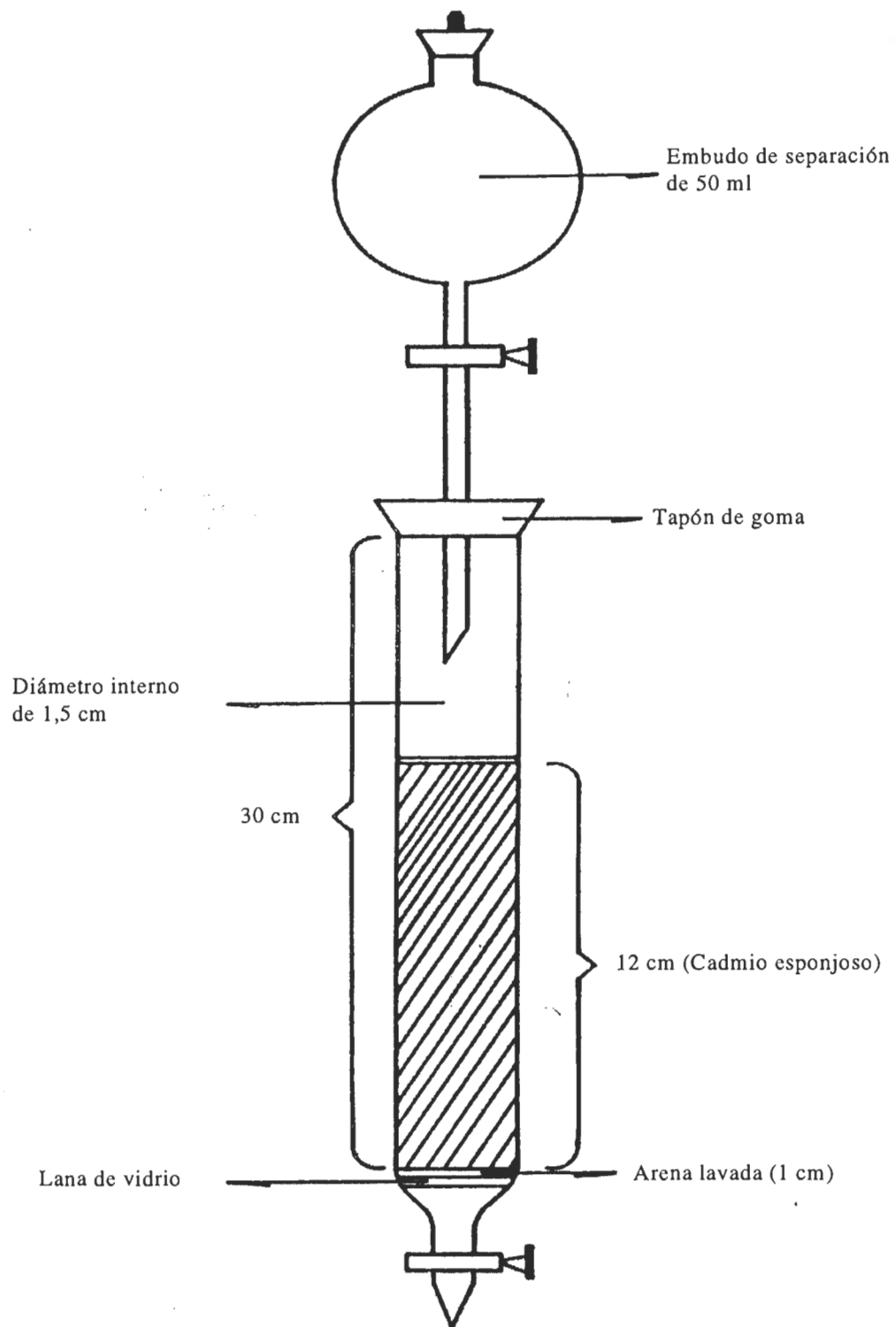


Figura 2