



Anales
de la Universidad
de Chile

Tabla de Contenidos

Número Actual

Números Anteriores

Presentación

Reseña Histórica

Numeración y Series

Comité Editorial

Normas Editoriales

■ Bromatología y tecnología de alimentos

[Seguridad alimentaria, necesidad de implementar técnicas modernas de análisis de xenobióticos en alimentos]

■ **Villegas, Ricardo; Mendoza, Néstor ; León N., Marisol**

Departamento de Brotomatología, Nutrición y Dietética,
Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción

■ RESUMEN

Se implementó y evaluó un método para la determinación de Nnitrosodimetilamina (NDMA) en harinas de pescado basado en la extracción de la nitrosamina con acetato de etilo, purificación del extracto por columna de sílicagel y cromatografía de éste en fase gaseosa con detector nitrógeno-fósforo específico (NPD). El método permite detectar la presencia de NDMA en muestras de harina de pescado en concentraciones tan bajas como 11 partes por billón.

El método se aplicó al análisis de 54 :muestras de harina de pescado fabricadas en industrias ubicadas en la VIII Región de Chile. El 17% del total de muestras analizadas presentaron contaminación con NDMA en concentraciones máximas de 45 partes por billón. Además, a estas muestras se les determinó el contenido total de bases Volátiles Nitrogenadas (TBVN), que permite estimar el estado de conservación de la materia prima utilizada en la fabricación de la harina y su contenido de nitratos y nitritos que posibilitan la formación de agentes nitrosantes. Los resultados obtenidos indican que no existe correlación entre estos parámetros y la presencia de NDMA. Esto impide la estimación de la presencia de esta nitrosamina a partir de las mediciones rutinarias de TBVN o de la mayor o menor concentración de las sales mencionadas.

■ Cita / Referencia

Villegas,Ricardo; Mendoza, Néstor; León N., Marisol. Seguridad alimentaria, necesidad de implementar técnicas modernas de análisis de xenobióticos en alimentos. Anales de la Universidad de Chile. VI serie: Nº11, agosto 2000

■ http://www2.anales.uchile.cl/CDA/an_completa

/0,1281,SCID%253D1583%2526ISID%253D7%2526ACT%253D0%2526PRT%253D1582,00.html

■ Presentación

Los programas de aseguramiento de calidad de los alimentos en Chile y en la gran mayoría de los países, con especial mención a los que participan del organismo mundial del comercio (O.M.C.), Codex Alimentarius, consideran diferentes aspectos relacionados con mantener inocuidad de los productos alimenticios y sus materias primas.

Se han desarrollado diferentes tecnologías, sistemas, cambios de procesos, todos ellos destinados a asegurar la calidad y cada vez aparecen o detectan nuevos riesgos, éstos debido al desarrollo técnico-científico de métodos de detección y cuantificación de compuestos que no eran detectables ni identificados por carecer de sistemas de análisis adecuados.

En la actualidad se han desarrollado técnicas analíticas muy sensibles las cuales han permitido identificar y cuantificar sustancias que se pueden proponer o agrupar bajo el nombre de Xenobióticos (Xeno=extraño, ajeno. Biótico=sistema biológico, sistema vivo) las que incluyen, por ejemplo, Micotoxinas, Nitrosaminas, Pesticidas, Agentes Tenoactivos, Dioxinas entre otras.

Su presencia en los alimentos afecta el aseguramiento de la calidad y pueden causar serios problemas al ser utilizados para consumo directo o bien como materia prima de alimentos.

La necesidad de realizar actividades de investigación destinadas a detectar y cuantificar objetivamente estos Xenobióticos en los alimentos, es una de las actividades que se está implementando en la Universidad de Concepción, con especial mención a Nitrosaminas y Micotoxinas.

Existe un riesgo potencial de toxicidad claramente demostrado en estudios científicos realizados en otros países y que tiene como causante la presencia de N nitrosodimetilamina, una potente hepatotoxina. En nuestro país, la información que se tiene respecto a estas sustancias en los alimentos y materias primas alimentarias es escasa. Controlar su formación disminuye el riesgo de producir y mejora la imagen de calidad de la industria tanto a nivel nacional como internacional y contribuye al desarrollo de una industria, con las consecuencias tanto económicas

como sociales que esto conlleva.

Una de las materias primas de gran producción en Chile es la harina de pescado, y el objetivo general de esta investigación es contribuir al mejoramiento de la calidad de las harinas de pescado nacionales evaluando la presencia de nitrosaminas en ella.

La investigación comprende desarrollar y poner en marcha una técnica analítica por cromatografía gaseosa para la detección y cuantificación de nitrosaminas volátiles en harinas de pescado. Detectar la presencia N-Nitrosodimetilamina y cuantificar ésta en las muestras de harinas de pescado producidas en la VIII Región, que resulten positivas.

En este trabajo se propone contribuir al mejoramiento de la calidad de los alimentos nacionales disminuyendo el riesgo de toxicidad por nitrosaminas en animales de criadero tales como cerdos, aves y peces.

El estudio de nitrosaminas en alimentos es de naturaleza compleja y difícil de lograr en un estudio simple. Por ello, se ha propuesto dividirlo en tres etapas constituidas por una detección, dilucidación de su mecanismo de formación y búsqueda de soluciones que permitan eliminar su presencia, o al menos controlar su formación.

Debido al escaso conocimiento que se tiene en Chile de la presencia de nitrosaminas en harinas de pescado y alimentos, se ha estimado necesario iniciar los estudios comprobando la presencia de ellas. Si bien son varias las posibles nitrosaminas que pudieran formarse en este producto, la más estudiada y no por eso menos tóxicas, es la N-nitrosodimetilamina. Su determinación es importante por sí misma y porque al darse las condiciones que se forme, nada impide que otras aminas nitrosables pudieran también hacerlo. Incluso éstas podrían ser del tipo no volátil como son los derivados de aminoácidos. Otra razón de iniciar el estudio con N-nitrosodimetilamina es por la acumulación de información bibliográfica respecto de esta nitrosamina en diversos tipos de alimentos posibilitando la comparación de resultados.

Importante es poder determinar el mecanismo de formación con el fin de evitar o disminuir los niveles en los diferentes alimentos, tendientes a controlar procesos tecnológicos o sugerir modificaciones.

La industria de harinas de pescado nacional representa un importante sector productivo con beneficios tanto económicos como sociales para el país. Su producto, la harina de pescado, debe ser de una calidad tal que la haga competitiva en los mercados internacionales y de aceptación en el nacional.

Muchos son los factores que determinan la calidad de una harina, como organolépticos, nutricionales, microbiológicos y toxicológicos, entre otros. De estos últimos destaca el control que actualmente se realiza sobre la formación de algunos compuestos como es la histamina y la mollerosina. Sin embargo, nada se ha realizado en el control de la formación de nitrosaminas que es una fuente potencial de gran toxicidad a nivel hepático, pudiendo provocar la muerte en animales de crianza. Nada justifica el que pudiendo mejorarse la calidad de las harinas no se realicen acciones que tiendan a revalorizarla evitando además, el riesgo de rechazo o la falta de confianza por parte de los criadores de aves de corral, sean éstos nacionales o internacionales.

En nuestro país son escasas las referencias que sobre el tema se han publicado, no existiendo mayor información de la presencia de nitrosaminas en harinas de pescado. A nivel internacional sólo hay intentos esporádicos que pusieron en evidencia su presencia pero no se hizo estudios de seguimiento. Probablemente esto se debe a que compete más dedicarse a la resolución de este problema a los países productores que a los compradores, pues es un deber del primero conocer sus recursos a fin de lograr un óptimo aprovechamiento.

La formación de nitrosaminas en las harinas de pescado, es posible por cuanto éstas teóricamente se forman cada vez que coexistan una amina nitrosable y un agente nitrosante, más condiciones ambientales que faciliten la reacción de nitrosación. Estos factores están presentes en la fabricación de las harinas. De una parte, la amina nitrosable proviene de la descomposición del óxido de trimetilamina naturalmente presente en pescados de agua salada. El agente nitrosante puede tener dos posibles orígenes, uno de ellos es la descomposición del nitrógeno atmosférico durante la etapa de secado de las harinas, el otro, es la presencia de nitritos en el agua de mar, el cual está presente por la naturaleza de la materia prima y por el uso del agua de mar en ciertas etapas del proceso.

Además, existen numerosas sustancias que pueden acelerar o retardar la formación de nitrosaminas. Como catalizadores de la reacción actúan la temperatura y la formalina. La temperatura, varía por el proceso y por la época del año en que ocurre el proceso (variación estacional o estacionalidad), en tanto que la formalina es una sustancia que en ciertas ocasiones es utilizada para conservar la materia prima mientras permanece en los pozos de almacenamiento.

En cuanto a las sustancias inhibitoras de la formación de nitrosaminas, se encuentran las sustancias de naturaleza fenólica. En la elaboración de harina de pescado es importante evitar la descomposición de la materia grasa que contiene, lo que se realiza adicionando el antioxidante etoiquina. Estudios realizados han demostrado que este compuesto puede actuar como inhibidor de la reacción de nitrosación.

I. Introducción

La presencia de ciertas sustancias en los alimentos puede significar muchas veces riesgos a los cuales se expone la población que los consume. Este riesgo puede ser mayor o menor dependiendo de la toxicidad de la sustancia. Algunas de ellas poseen gran potencia toxicológica de tal forma que el riesgo se ve aumentado aún cuando están presentes en cantidades muy pequeñas. Esto es justamente, lo que sucede con cierto grupo de compuestos n. itrosados denominados nitrosaminas. Su importancia toxicológica deriva de la gran capacidad que han demostrado poseer, en animales de experimentación, para producir cáncer.

Los países desarrollados, conscientes de este riesgo, han adquirido un amplio conocimiento del nivel en que estas sustancias están presentes en sus alimentos, lo que les ha permitido ejercer un efectivo control de su formación que se traduce en niveles tan bajos que, a la luz de los conocimientos

actuales, su consumo no representa gran riesgo para la salud de los consumidores. Es destacable que la naturaleza no sintetice estos compuestos, salvo en muy raras excepciones y por tanto quien determina su formación en alimentos a partir de los precursores, que si son proporcionados por ella, son fundamentalmente el procesamiento al que son sometidos. Aquí intervienen por tanto no sólo las materias primas usadas en la preparación de alimentos, sino que también son determinantes los hábitos alimentarios de la población.

En nuestro país, la situación relativa al control de formación de nitrosaminas en alimentos, es muy diferente a la de los países desarrollados pero común a muchos en vías de desarrollo, tanto de nuestra región como de otros lugares del mundo. Probablemente, la razón primordial es que hay necesidades más apremiantes que tienen prioridades por sobre este control, ya sea porque su relación con la salud de la población es más evidente o bien porque requiere implementar técnicas analíticas onerosas.

Bajo las actuales circunstancias, hemos intentado desde hace ya varios años, ir generando antecedentes en nuestro medio que nos permitan, aún con todas sus limitaciones, tener una visión aproximada del nivel en que se encuentra la Nnitrosodimetilamina (NDMA) en ciertas bebidas y alimentos como son la cerveza (Villegas et al., 1985) y las cecinas (Mendoza et al., 1993). Las autoridades sanitarias conscientes del riesgo que significa su presencia en nuestros alimentos, han establecido en el último Reglamento Sanitario de los Alimentos (Ministerio de Salud, 1997) los niveles máximos permisibles. Si bien este gesto de la autoridad no implica necesariamente ejercer un control de alimentos con este objetivo, al menos demuestra la intención de ejercerlo cuando las condiciones analíticas de los laboratorios de control lo permitan.

Con el mismo objetivo y considerando nuestra estrecha relación con el medio pesquero, hemos realizado estudios para detectar estos compuestos en harinas de pescado. En este producto hemos centrado el esfuerzo en desarrollar un método que sea lo suficientemente práctico como para ser aplicado en su control de calidad.

Si bien las nuevas tecnologías hacen suponer que disminuyen el riesgo de la formación de NDMA, no es posible descartarlo plenamente, debido a que en las plantas reductoras se utiliza agua de mar, que contiene nitritos, en tanto que el pescado contribuye con las aminas nitrosables, restando sólo que las condiciones del procesamiento faciliten o no la formación de estos compuestos.

De ahí, la necesidad de contar con un método que pueda utilizarse en determinarla formación de la NDMA, tanto en el producto final como en los productos intermedios. En el presente trabajo se desarrolla un método sencillo que permite detectar y cuantificar, por cromatografía gaseosa acoplada a un detector específico (GC-NPD), NDMA en harinas de pescado en niveles tan bajos como 11 partes por billón.

■ Materiales y métodos

A menos que se indique lo contrario, todos los solventes y reactivos utilizados fueron de procedencia Merck y calidad para análisis.

La solución madre del estándar NDMA de procedencia Sigma, se preparó en concentración de 1mg/ml en acetato de etilo y fue mantenida en refrigeración y al abrigo de la oscuridad hasta su uso.

Las columnas cromatográficas se prepararon en tubos de polipropileno del tipo usado en extracciones en fase sólida de 3 ml de capacidad. Estos fueron llenados con sílica gel con tamaño de partícula 0,063-0,200 mm, hasta una altura de 1,5 cm procurando mantener una compactación uniforme.

El método una vez evaluado de acuerdo a procedimientos establecidos (Quattrocchi et al, 1992), fue aplicado al análisis de muestras de harinas de pescado obtenidas al azar que procedían de fábricas establecidas en la VIII Región.

Para la detección y cuantificación de NDMA se usó cromatógrafo gaseoso Varian 3400X con detector NPD y columna capilar PTA 30 m, presión 15 psi, temperatura columna 60°C con mantención de 1 minuto y luego a 250°C con 15° por minuto y mantención de 2,5 minutos. Inyector a 270°C y detector 300°C. El análisis de datos se realizó con una estación de trabajo Hewlett Packard A/D Chem Station Software.

Para el análisis de harinas de pescado, en tubo de ensayo con tapa, se pesó 5g de muestra y adicionó 5ml de acetato de etilo. Se agitó en agitador mecánico Edmund Bohler KL2 por 30 minutos y luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Un ml de sobrenadante se pasó a columna de silicagel preacondicionada con éter etílico. Posteriormente, se pasó por la columna en forma sucesiva 3ml de n-hexano y 2 ml de acetato de etilo, descartando los eluidos. Se eluyó la columna con 6 ml de acetato de etilo que fue recibido en tubo concentrador Kuderna-Danish, luego se concentró en rotavapor hasta 0,5 ml a 60°C y finalmente se inyectó 1 µl.

Complementariamente se determinó en las muestras, de acuerdo al manual ISP (ISP, 1998) el Total de Bases Nitrogenadas Volátiles (TBVN) y su contenido de nitritos y de nitratos extrayendo estos últimos según Mirna y Grau y cuantificando de acuerdo a métodos Hach (Hach, 1995).

Resultados y discusión

De la evaluación del método se estableció que la sensibilidad de éste para NDMA fue de 30 ppb. Se observó además, un comportamiento lineal entre cero y 300 ppb que correspondió a $y=14288x - 89853$ con $r=0,995$. Los límites de detección y de cuantificación, usando concentraciones de 80, 120 y 180 ppb, fueron de 11 y 21 ppb, respectivamente. Estos últimos valores se contraponen a la sensibilidad ya que la señal a tan bajo nivel se confundiría con el ruido. Aún así, el método presenta una muy buena sensibilidad al compararlo con las 500 ppb que nos da la literatura (Supelco, 1982) lo cual se debe, en gran medida, al uso de la estación de trabajo en el análisis de datos.

Análisis de muestras:

Se analizaron 54 muestras de harina de pescado, de las cuales 12 resultaron positivas en un primer análisis, lo que corresponde al 22% de muestras sospechosas. La presencia de NDMA fue confirmada en 9 de estas muestras por spiking y con un nuevo análisis concentrando a 250 μ l e inyectando 3 μ l.

Estos análisis fueron complementados con la determinación de nitritos y nitrosos que pueden generar agentes nitrosantes y con la determinación de TBBVN como posible responsable de aportar la amina nitrosable. En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos de los parámetros referidos en aquellas muestras en que se confirmó la presencia de NDMA.

La concentración mínima y máxima encontrada en el total de muestras analizadas fue de 77 y 220 mg%, respectivamente en tanto que el valor máximo encontrado en estas muestras positivas es de 151. Estos últimos valores son aceptables para harinas frescas cuyo valor máximo para harinas tipo «prime» es de hasta 120mg% y para harinas estándar A entre 120 y 150mg%. De estos resultados, se desprende que el grado de alteración de la harina no guarda una relación directa con el estado de conservación del pescado y por ende una harina de alta calidad como la «prime» no debe suponerse a priori que esté exenta de contaminación.

En cuanto a los máximos y mínimos encontrados en el total de muestras fueron de 15,6 y 4,8 ppm para nitrosos y de 0,05 y 0,001 ppm para nitritos. La concentración de estas sales, tal como se muestra en la Tabla 1, varía muy poco en las muestras positivas lo que dificulta el establecimiento de una relación con los niveles de NDMA encontrados.

Las concentraciones de NDMA que van desde las 46 hasta las 15 ppb son bajas si se las compara con los 0,12 a 0,45 ppm informados en la literatura. La probable explicación a ello es que las harinas analizadas corresponden a harinas de alta calidad y que han sido fabricadas con tecnología de secado indirecto, que si bien impide la formación de agente nitrosante por descomposición del nitrógeno atmosférico a nivel de los quemadores, no evita la posible formación de éste a partir de los niveles de nitrito que contiene el agua de mar involucrada en el proceso.

Tabla 1.- Análisis comparativo de muestras que contienen NDMA

N° de Muestra	NDMA (ppb)	TBBVN (mg%)	Nitrito (ppm)	Nitroso (ppm)
1	16,1	148	0,016	8,9
2	45,2	148	0,022	6,2
3	26,7	126	0,021	9,5
4	39,1	136	0,021	9,0
5	46,0	123	0,025	8,9
6	22,9	151	0,021	6,2
7	22,4	106	0,024	8,3
8	15,5	77	0,025	7,0
9	29,6	114	0,023	6,7

Las ventajas del método comparado con los que normalmente se encuentran en bibliografía, es que la extracción se realiza con acetonitrilo en vez de diclorometano lo que mejora grandemente el tipo de cromatograma obtenido, porque no produce dopaje del detector y porque el extracto es más limpio, lo que sumado al proceso de clean up, da un extracto con mucho menos grasa que los métodos normalmente propuestos, permitiendo aumentar el volumen inyectado hasta 3 μ l. Los volúmenes de solvente empleados en todo el proceso son fracciones mínimas de los que requieren otros métodos recomendados. Esto no sólo produce ahorro en volumen de solvente empleado sino que, además, hace al método más rápido, lo que unido a la mayor sensibilidad lograda lo convierte en una alternativa a considerar en el control de este tipo de contaminante.

Comentario. La seguridad alimentaria pasa invariablemente por el control de alimentos y entre éstos el químico se torna cada vez más exigente debido a que si bien antes era suficiente el análisis físicoorganoléptico, los procesos a que son sometidos los alimentos, sumados al hecho de un medio ambiente cada vez con mayores riesgos de contaminación producen la presencia de sustancias riesgosas en concentraciones tales que escapan a nuestros sentidos. Como se ha demostrado el riesgo que ellas significan, deben ser controladas para asegurar la salud de la población. No sólo porque exista un potencial riesgo toxicológico inmediato sino porque, además, puede ser un efecto a largo plazo que cabe ahora evitar. Desgraciadamente, esto requiere cada vez de mayor disposición de instrumental analítico, el cual muchas veces está fuera de alcance, pero si consideramos que el proceso de contaminación en términos prácticos es irreversible, bien podríamos suponer que más temprano que tarde, debemos asumir este control que va mucho más allá que las nitrosaminas, pues de cuando en cuando aparecen nuevos contaminantes como son los PCBs o las dioxinas tan en boga por estos días. Obviamente no será posible su control si no se dispone de capacidad analítica que considere aparte de la implementación material de los laboratorios, el adiestramiento de las personas que asuman el reto de los tiempos por venir.

Agradecimientos:

Dirección de Investigación Universidad de Concepción.
Proyecto DIUC 96.074.021-1

Bibliografía

- 1.- VILLEGAS, R., MENDOZA, N., BARRIOS, C «*Quantitative Determination Of Nnitrosamines in Beer by High Performance Thin Layer Chromatography*». En *Instrumental High Performance Thin Layer Chromatography*. Bad Durkheim-1, Germany 223-226, 1985.
- 2.- MENDOZA, N., VILLEGAS, R., SAELZER, R., VALLADARES, J., BARRIOS, C. «*Distribución y Concentraciones de N-nitrosodimetilamina y Nnitrosodietilamina, y N-nitrosopirrolidina en Productos Cárnicos Curados*». *Alimentos N°4 Vol.18, I S-19, 1993*.
- 3.- MINISTERIO DE SALUD. «*Reglamento Sanitario de Alimentos*». *Diario Oficial, 13 de mayo de 1997*.
- 4.- QUATTROCCHI, O. ABELAIRA, S., LABA, R. En: *Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica*. Artes Gráficas Farro SA, California 2750/52 (1289) Buenos Aires. 301-328.
- 5.- INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA (ISP). *Manual Métodos de Análisis Físico-Químicos de Alimentos, Aguas y Suelos*. Impreso Andros Ltda., Sta. Elena, 1955, Santiago, 1998.
- 6.- HACH COMPANY. *Hach Company Water Analysis Handbook*. P.O. box 389 Loveland, Colorado 80539, U.S.A., 1992.

[Presentación](#) | [Resumen](#) | [Introducción](#) | [Materiales y métodos](#) | [Resultados y discusión](#) | [Bibliografía](#) | [Versión Completa](#)
(Imprimir)

Sitio desarrollado por [SISIB - Universidad de Chile](#)