

Efecto de la adición de eritorbato y nitrito de sodio sobre la concentración de nitrito residual y color en mortadela

Laura María Medina Alzate

Proyecto de grado para optar por el título de Química

Director

Luis Javier López Giraldo

Dr. Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos

Codirector

Arley René Villamizar Jaimes

Químico, MSc

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

A la vida.

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de vivir y continuar de pie en cada una de las situaciones vividas durante la ejecución de mis proyectos de vida.

Al CICTA, en especial al Dr. Luis Javier López y MSc. Arley René Villamizar por su aporte en mi formación académica y culminación de este proyecto.

Al Sena y en especial al Ingeniero de alimentos Edwin Gerson Montañez Gonzalez por su aporte para la ejecución de este proyecto de investigación.

A la Dr Aidé Perea y el Dr. Daniel Molina por la evaluación del presente documento.

A los compañeros del laboratorio de alimentos por cada una de los momentos compartidos.

Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Marco Teórico y Estado del Arte.....	17
1.1 La carne.....	18
1.2 Los embutidos y su clasificación	19
1.3 Antioxidantes	21
1.3.1 Eritorbato de sodio.....	22
1.4 El nitrito y el curado en los embutidos	23
1.5 La Mb y su influencia en el color	27
1.5.1 Características de color según las especies derivadas de la mioglobina.....	28
1.6 Antecedentes cuantificación de nitritos en embutidos.....	30
1.6.1 Espectroscopía UV-vis y reacción de GRIESS	32
1.7 Sistema RGB y el color en mortadelas	34
2. Metodología	35
2.1 Proceso de fabricación de una mortadela.....	35
2.2 Diseño experimental para la formulación de mortadelas con concentración variable de nitrito de sodio y eritorbato de sodio	38
2.3 Cuantificación de nitritos.....	39
2.3.1 Preparación de la muestra y lectura por Espectroscopía UV- vis	39

2.3.2 Preparación de la curva de calibración de nitritos	40
2.3.3 Análisis de concentración de nitrito residual	40
2.4 Evaluación de color.....	41
2.4.1 Registro Fotográfico	41
2.4.2 Análisis RGB	42
2.4.2.1 Descenso de color	42
2.4.2.2 Variación de color en la coordenada R	42
3. Resultados y Discusión	42
3.1 Cuantificación de nitrito residual.....	42
3.2 Evaluación de la variación del color rojo (R) con las formulaciones de mortadela.	48
4. Conclusiones	56
Referencias Bibliográficas	57
Apéndices.....	63

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Concentraciones de sales de nitrito residual permitidas en embutidos en algunos países de alta demanda y Colombia.	26
Tabla 2. Característica de la mioglobina según el tipo de pigmento y color exhibido	29
Tabla 3. Autores con investigaciones basadas en la determinación de nitritos.	31
Tabla 4. Ingredientes empleados para la formulación de las mortadelas formuladas.	36
Tabla 5. Diseño experimental	38
Tabla 6. Curva de calibración para nitritos.	40
Tabla 7. Concentraciones de nitrito de sodio residual para las mortadelas analizadas.....	43
Tabla 8. Valores en R para las mortadelas analizadas	49
Tabla 9. Registro fotográfico mortadela 1.	51
Tabla 10. Degradación del color en el día 30 (%).	53
Tabla 11. Registro fotográfico mortadela 5 y 6.	54
Tabla 12. Mortadelas con mejor comportamiento según el parámetro.....	55

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Proceso general para la fabricación de una mortadela.	21
Figura 2. Ácido ascórbico y sus sales.	22
Figura 3. Diagrama de reacciones establecidas para el desarrollo de color en embutidos.	24
Figura 4. Reacciones químicas de equilibrio entre la mioglobina y sus derivados.	27
Figura 5. Desarrollo del color según las reacciones desarrolladas con la mioglobina.	30
Figura 6. (a) Mecanismo de la reacción de GRIESS. (b) Visualización de la reacción de Griess con diferentes concentraciones o ausencia de NO_2^-	33
Figura 7. Representación del sistema RGB.	35
Figura 8. Diagrama para el proceso de manufactura de mortadela.....	37
Figura 9. Proceso de mezclado o cutteado para la obtención de la pasta.	38
Figura 10. Caja aislada de la luz del medio para el registro fotográfico.	41
Figura 11. Concentración de nitrito residual para cada una de las mortadelas formuladas. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un valor $p < 0,05$	45
Figura 12. Efecto de la concentración de nitrito de sodio y eritorbato de sodio, sobre la concentración de nitrito residual en mortadela (día 1 de formulación).	47
Figura 13. Concentración de nitrito residual para las mortadela 1 (formulación inicial nitrito de sodio:eritorbato de sodio 50:500 mg/kg), mortadela 3 (formulación inicial nitrito de	

sodio:eritorbato de sodio 200:500 mg/kg) y mortadela 6 (formulación inicial nitrito de sodio:eritorbato de sodio 125:250 mg/kg).	48
Figura 14. Efecto de la concentración de nitrito de sodio y eritorbato de sodio, sobre el color en la coordenada R en mortadela.....	50
Figura 15. Gráfico de contornos para la evolución del color de la mortadela 1.	51
Figura 16. Evolución de la coordenada R en el cubo RGB Mortadela 1 NO ₂ :200 - C ₆ H ₇ NaO ₆ :500.	52
Figura 17. Gráfico de contornos para la evolución del color de la mortadela 5 y 6.	54

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Gráficas de la variación de la concentración de nitrito de sodio en 30 días.....	63
Apéndice B. Gráficas de contorno para cada mortadela en los días 1 y 30.....	68
Apéndice C. Variación en la coordenada R para todas las mortadelas.....	73

Abreviaturas

ICONTEC: Instituto Colombiano de Norma Técnica y Certificaciones

Mb: Mioglobina

MetMb: Metamioglobina

NOMb: Nitrosomioglobina

NTC: Norma Técnica Colombiana

OMb: Oximioglobina

OMS: Organización Mundial de la Salud

RAE: Real Academia Española

RGB: Sistema Rojo, Verde y Azul

SENA: Servicio Nacional de Aprendizaje

Resumen

Título: Efecto de la adición de eritorbato y nitrito de sodio sobre la concentración de nitrito residual y el color en mortadela*.

Autor: Laura María Medina Alzate**

Palabras clave: NITRITO, ERITORBATO, MORTADELA, EMBUTIDOS, COLOR.

Descripción:

La conservación de los embutidos en general, es uno de los grandes retos para la industria cárnica hoy en día. El nitrito de sodio además de actuar como conservante en los embutidos también contribuye como fuente directa de óxido nítrico para la generación del color característico de cárnicos curados tras la interacción con la mioglobina presente en la carne. Compuestos como el eritorbato de sodio presente en la formulación de las mortadelas disminuye el contenido de nitrito de sodio, favorece la producción de NO y consecuentemente la formación NOMB, pigmento asociado al color rosa de las mortadelas. Las entidades sanitarias en Colombia permiten un máximo de 200 mg/kg de nitrito de sodio residual en la formulación general de embutidos; no obstante, se busca reducir el uso de este aditivo por los diferentes riesgos a la salud que se han presentado desde décadas atrás. En este trabajo se determinaron mediante espectroscopía UV-vis, los valores de concentración de nitrito residual presentes en diferentes formulaciones de mortadela y se compararon con los valores de color obtenidos mediante el sistema rojo, verde y azul, RGB, relacionando la concentración de nitrito residual y los pigmentos asociados a la tonalidad de la mortadela. Una concentración de 50 mg/kg de nitrito de sodio junto con 250 mg/kg de eritorbato de sodio en la formulación inicial de la mortadela permitió conservar por 30 días el color con una concentración de nitrito residual de 44,10 mg/kg en el día 1 y un descenso hasta 14,76 mg/kg en el día 30.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de química. Director Luis Javier Lopez Giraldo

Abstract

Title: Effect of the addition of sodium erythorbate on the concentration of residual nitrite and color in mortadella*

Author: Laura María Medina Alzate**

Keywords: NITRITE, ERYTHORBATE, MORTADELLA, SAUSAGES, COLOR.

Description:

The conservation of sausages is one of the main challenges for the meat industry today. Sodium nitrite acts as a preservative in sausages and contributes as a direct source of nitric oxide in coloration of cured meats after the interaction with the myoglobin present in the meat. Different compounds in the mortadella's formulation such as sodium erythorbate can decrease the residual nitrite content. Sanitary entities in Colombia allow a maximum of 200 mg / kg of residual sodium nitrite in the formulation of sausages; however, it is necessary to reduce the use of this additive due to the health risks that have been arise decades ago. The concentration values of residual nitrite and derivatives of Mb were determined using UV-Vis spectroscopy, the results were compared with the color values obtained by the red green blue, RGB, system to establish an approximation in the concentration ratios of these compounds and an attractive coloration in commercial mortadella. The concentration was decreased up to 50 mg / kg of sodium nitrite additionally with 250 mg / kg of sodium erythorbate in the formulation of a mortadella allowed to conserve the color for 30 days without exceeding the allowed concentration of residual nitrite in mortadella whit a concentration of 44,10 mg/kg on first day and a decline to 14,76 mg/kg on day 30.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de química. Director Luis Javier Lopez Giraldo

Introducción

El proceso de fabricación de las mortadelas se caracteriza por el uso de nitrito y eritorbato de sodio como aditivos que tienen como finalidad mejorar las propiedades organolépticas y la conservación del producto. La mezcla de estos aditivos junto con otros procesos fundamentales como el tratamiento a diferentes temperaturas dentro de la fabricación de los embutidos, hacen que se pueda obtener un producto característico en color, olor y aroma; sin embargo, el desconocimiento de como la relación nitrito-eritorbato afecta la concentración de nitritos residuales, el desarrollo del color y otras propiedades, podría causar pérdidas económicas (Vargas Velásquez, López Reinoso, & Flores Artunduaga, 2014).

El eritorbato de sodio y el nitrito de sodio junto con la mioglobina (Mb) hacen parte de una serie de reacciones que desarrollan el color rosa característico de las mortadelas tras un proceso térmico (Tarté, 2009). Una relación inadecuada de los aditivos mencionados facilita la formación de derivados de Mb como la metamioglobina (MetMb), dando lugar a tonalidades pardas de difícil aceptación por los consumidores, quienes las asocian con un producto de baja calidad o en estado de descomposición (Benzzo, 2005; Sainz & de la Torre, 1993).

Las empresas dedicadas a la elaboración de embutidos, entre ellos las mortadelas, manejan sus propias formulaciones en cada línea de productos, esto permite darles un sello único frente al color que pueda percibir el consumidor en el producto terminado, e influye en el proceso de elección de una marca específica al momento de adquirir la mortadela. Relaciones inadecuadas de eritorbato de sodio y nitrito de sodio podría hacer que los productos formulados por las empresas exhiban

tonalidades marrones y superen los valores de concentración de nitrito residual, obteniendo así productos inadecuados para el consumo humano (Lopez F. & Ramirez Zelaya, 2014).

En 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una alerta por consumo excesivo de carnes procesadas, enfatizando en la posible relación entre el consumo y el riesgo a padecer algunas enfermedades, entre estas el cáncer, causado por compuestos como las nitrosaminas formadas por la presencia en exceso de aditivos como los nitritos (Antón & Lizaso, 2001; Lopez F. & Ramirez Zelaya, 2014; Ventanas, Martín, Estévez, & Ruiz, 2004). En Colombia, el INVIMA y Ministerio de Salud se rigen actualmente por la resolución 4125 de 1991 y el decreto 2162 de 1983 del Ministerio de Salud, en los que se estipula una concentración máxima de 200 mg/kg de nitritos residual en una formulación de embutidos en general para un período de conservación máximo de 30 días (Decreto Numero 2162, 1983). Hoy día las empresas productoras de embutidos buscan disminuir los costos asociados con la formulación al tiempo que el producto cumpla con las restricciones en términos legales de máximos contenidos de nitritos residuales. Para tal fin, dichas empresas incluyen en su formulación el eritorbato de sodio; no obstante, hace falta conocimiento asociado al impacto que este aditivo puede tener sobre la estabilidad del color y la concentración residual de nitritos de los embutidos tipo mortadela (Ayala, García, Sánchez, Jirón, & Espinoza, 2016).

Mantener el color y la concentración de nitrito residual en los márgenes reglamentados por la legislación actual, proporcionará a las empresas productoras una ventaja a la hora de usar la mezcla eritorbato de sodio y nitrito de sodio en sus formulaciones (Arnau Arboix et al., 2013; Ayala et al., 2016).

El presente trabajo busca determinar una relación adecuada de eritorbato de sodio y nitrito de sodio que permita obtener concentraciones de nitrito residual que cumplan con las normas

estipuladas por los organismos de control y mantener el color de mayor intensidad en la coordenada R del sistema RGB en la mortadela durante el tiempo máximo de almacenamiento permitido.

1. Marco Teórico y Estado del Arte

El Dr. Eduard Polenske, fue uno de los primeros investigadores en establecer correctamente el papel que juegan las sales de nitrito en el curado de la carne. Él desarrolló investigaciones durante la década de 1880 donde estableció que la presencia de nitritos en los cárnicos correspondía a un proceso de reducción dado a partir de las sales de nitrato y la intervención de algunas bacterias presentes en la carne (García G., 2015; Tarté, 2009). En 1899 Polenske concluyó que los atributos de coloración que se observaban en el proceso de curado de las carnes está asociado directamente con las interacciones químicas que se daban entre el nitrito y otras especies presentes en los embutidos (Tarté, 2009).

La sal de nitrito ha sido usada para que las carnes conserven características organolépticas y microbiológicas adecuadas (Sindelar & Milkowski, 2011) el mayor tiempo posible. Los compuestos encargados de las propiedades asociadas al color rojo o rosa, involucran una serie de reacciones establecidas por completo en 1914 por Haldane y Hoagland para las carnes curadas. Estos investigadores evaluaron la descomposición del nitrito a especies como el ácido nitroso (HNO_2) y óxido nítrico (NO), destacando la acción determinante de bacterias, enzimas y proteínas como la mioglobina (Ventanas et al., 2004). En 1970 la OMS hace pública la preocupación del

manejo desmedido o sin control de las sales nitradas en cárnicos curados; evidenciando que un alto consumo de embutidos puede causar afecciones sobre la salud, debido a, la formación de nitrosaminas (compuestos potencialmente cancerígenos) desde el nitrito residual (Arnau Arboix et al., 2013; Keeton, Osburn, Hardin, Bryan, & Longnecker, 2012; Rada-Mendoza, A, Alejandra Daniela, & Usuriaga, 2016).

Por lo anterior, a partir de 1982 se inicia la búsqueda de alternativas eficientes para reemplazar el uso de nitritos en embutidos, algunas de las alternativas postuladas para la fecha fueron el uso de ingredientes como ácido ascórbico, ascorbato (isómero óptico del eritorbato), α -tocoferol, ácido láctico, sorbatos de potasio, hipofosfatos de sodio, ésteres de fumarato e inclusive el sometimiento de los diferentes productos cárnicos a fuentes de radiación para la eliminación de algunos microorganismos (Castañeda, Galán-Vidal, Rodríguez, Contreras-López, & Ramírez, 2010).

1.1 La carne

El Decreto 2162 de 1983 de Colombia, define la carne como la parte muscular comestible constituida por los tejidos blandos que rodean el tejido esquelético de animales de abasto que son sacrificados para el consumo humano. La carne es el ingrediente fundamental en todos los productos embutidos, para el caso de Colombia la producción de este tipo de alimentos contiene principalmente carne de cerdo, bovina y/o pollo.

La carne en su constitución posee una gran cantidad de proteínas, vitaminas, minerales y grasas, entre otros; estos componentes contribuyen con el desarrollo de características propias de la carne y sus derivados procesados como el color, sabor y aroma, junto con un aporte nutricional de gran importancia a una dieta debidamente balanceada (Ahmad & Badpa, 2014; Anicama, 2014).

1.2 Los embutidos y su clasificación

Los embutidos o productos cárnicos procesados son aquellos que durante su fabricación modifican las características principales de la carne mediante diferentes etapas tales como: cambios físicos (picado de la carne), procesos térmicos y la adición de diferentes ingredientes que alteran las propiedades químicas de componentes propios de la carne; modificando la apariencia natural del producto (Gil S., 2009).

Según la Norma Técnica Colombiana (NTC) 1325, “*Industrias Alimentarias. Productos cárnicos Procesados no enlatados.*”, embutido está definido como un producto a base de carne que se procesa de forma cruda, cocida o escaldada y es introducido en tripas naturales o sintéticas. Su clasificación está dada según el tipo de proceso y formulación a la cual se encuentre sometido; de manera general se pueden tener tres tipos de embutidos: crudos frescos, escaldados, y crudos madurados. Dentro de cada una de estas clasificaciones se encuentran algunos embutidos típicos como la mortadela, la salchicha, el chorizo, el jamón, el salchichón, entre otros (Ortiz, 2002).

La mortadela se define como un embutido cocido, procesado y escaldado, es decir, que en su proceso de fabricación se realiza un tratamiento térmico para obtener la textura y características propias, su elaboración cuenta con diferentes ingredientes los cuales varían según la formulación del fabricante. Los aditivos son característicos en este tipo de embutidos, pero su uso debe estar avalado y permitido por el INVIMA y Ministerio de Salud, para el caso de Colombia. La disposición de un bache de formulación se da en tripas autorizadas ya sean sintéticas o naturales donde el diámetro debe ser de 80 mm en adelante (Gil S., 2009).

En Colombia una de las mortadelas con mayor aceptación y distribución es la Mortadela Tradicional Zenú, un favoritismo del 90% según el grupo de análisis BRANDSTRAT en el diario

La República, tras un estudio realizado a la población entre 12 y 55 años de las principales ciudades del país en 2015.

Para la formulación general de una mortadela se requiere el seguimiento de etapas características, Figura 1, y el uso de ingredientes puntuales, la presencia o ausencia de cualquier ingrediente estará totalmente ligada a las características de producción de cada fabricante. Dichas características ofrecen a cada empresa productora un sello en el mercado y puede estar asociado a temas de olor, color o sabor. Para cualquier formulación es importante tener en cuenta que la carne usada en la fabricación de una mortadela debe ser carne proveniente de animales adultos para lograr un alto contenido de proteínas, compuestos importantes para el desarrollo de color en la mortadela (FAO, IICA, & Prodar, 2003).

Dentro de la formulación de una mortadela la acción y presencia de ingredientes como los antioxidantes y los conservantes, en las concentraciones adecuadas, brindan diversos beneficios a los productos formulados como sabor, olor, textura y apariencia física. El desarrollo del color para un embutido tipo mortadela se determina en dos etapas: cutteado donde el nitrito es adicionado y mezclado junto a la carne y el proceso térmico donde el NO, producto de las reacciones químicas del ambiente de la mortadela, se fija al sitio activo de la Mb (Huanca & Solis, 2010; Jaya, 2004; Lago, 1997; Moreno, 2014).

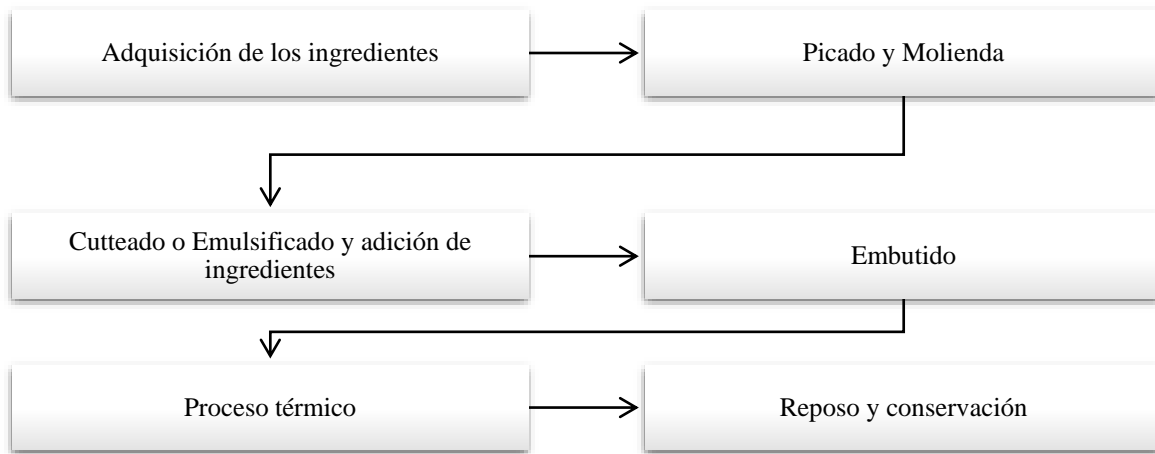


Figura 1. Proceso general para la fabricación de una mortadela.

1.3 Antioxidantes

Los antioxidantes cumplen un papel fundamental en la preparación de productos cárnicos. El L-ascorbato de sodio o potasio, junto con su isómero óptico el eritorbato, son sales derivadas del ácido ascórbico altamente utilizadas en las formulaciones de los embutidos; siendo el eritorbato de sodio el más común, económico y atractivo en el momento de la fabricación, Figura 2 (Cervellini, Nario, & Díaz, 2015).

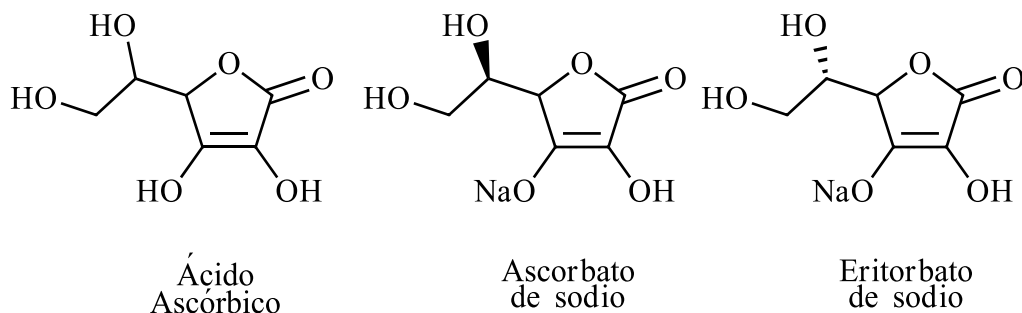


Figura 2. Ácido ascórbico y sus sales.

1.3.1 Eritorbato de sodio El eritorbato de sodio es uno de los isómeros ópticos derivados del ácido ascórbico, y al igual que el ácido, participa en reacciones donde actúa como un fuerte antioxidante y en la inhibición de algunos microorganismos (Zhang, 2013). El eritorbato no es una molécula que se ingiera en la dieta habitual de un ser humano y su obtención se da de manera sintética; sin embargo, las funciones de las sales del ácido ascórbico son las mismas: reducir el ion nitrito para la producción de óxido nitroso acelerando el proceso de obtención de tonalidad roja-rosada en las carnes, intensificar el sabor que identifica a los productos embutidos, disminuir la cantidad de nitrito residual, generar medios balanceados de pH, evitar la formación de compuestos tipo nitrosaminas a largo plazo e inhibir el crecimiento de algunos microorganismos que en el cuerpo humano son de alto riesgo para la salud (Jaya, 2004; Keeton et al., 2012; Martín Juárez, 2005; Tarté, 2009).

El eritorbato de sodio reacciona con el anhídrido nitroso en las mortadelas para obtener NO, tal como se muestra en la Figura 3, reacción (f). El cambio de ácido ascórbico por eritorbato de sodio ha sido una alternativa de bajo costo con los mismos efectos del ácido sobre las mortadelas (Cobos & Díaz, 2015; Freixanet, 2006).

1.4 El nitrito y el curado en los embutidos

La adición de sales o proceso de curación cumple diferentes funciones como la inhibición de la formación o crecimiento de microorganismos, conservación, aspecto y sabor del embutido (Lugo, 2008). El nitrito como ion es una especie altamente reactiva en un ambiente tan diverso como el de las mortadelas; el ion puede obtenerse por la adición directa como sal de nitrito o como sal de nitrato, presentando reacciones de oxidación, reducción o nitración, según sea el ambiente químico (Alvarado A. & Esquivel L., 2016; Cobos & Díaz, 2015; Tarté, 2009).

Diversas investigaciones han propuesto las diferentes funciones y rutas de reacción conocidas hoy en día a partir del nitrito; sin embargo, aún no son del todo claras ni se han logrado establecer por completo (Cobos & Díaz, 2015; Tarté, 2009). Las reacciones propuestas para el proceso de curación de los embutidos, el desarrollo del color característico en ellos, así como las rutas por medio de las cuales se observa la transformación del nitrito y la interacción que tiene con el eritorbato se muestran en la Figura 3 (Alvarado A. & Esquivel L., 2016; Gallego Restrepo, 2013; Jaya, 2004; Martín Juárez, 2005).

La condición de partida necesaria para que las sales de nitrito se disocien es la presencia de agua como se observa en la reacción a (Figura 3); una vez disociada la sal de nitrito, los iones pueden reaccionar con protones que se encuentren en el medio (pH entre 5,5 y 6,0), dando paso a la formación de ácido nitroso (HNO_2) reacción b. El HNO_2 es una especie altamente inestable, su conversión o descomposición se puede dar en las especies de la Figura 3., reacciones c, d y e (Teijón, Pérez García, Olmo López, & García Albenda, 1996).

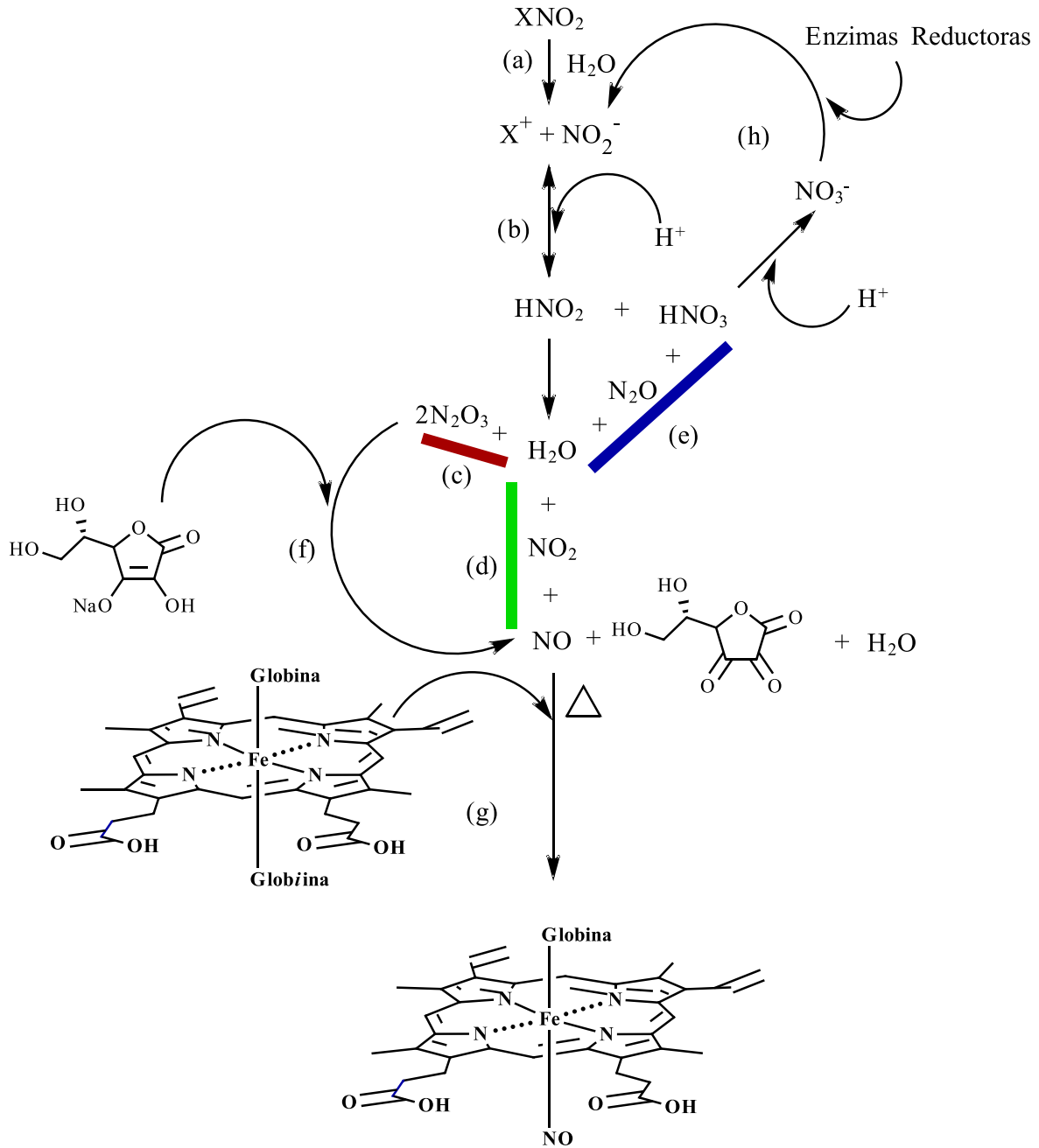


Figura 3. Diagrama de reacciones establecidas para el desarrollo de color en embutidos.

Nota: adaptado de (Alvarado A. & Esquivel L., 2016; Gallego Restrepo, 2013; Jaya, 2004; Martín Juárez, 2005)

Se considera el HNO_2 como una fuente directa de NO; sin embargo, las diferentes especies formadas a partir de otras rutas de reacción también dan como resultado la formación de NO. El

anhídrido nitroso (N_2O_3) producto de reacción del HNO_2 tiene la capacidad de disociarse para obtener el NO; no obstante, en el ambiente químico de la formulación de los embutidos se encuentran algunos reductores como el eritorbato de sodio que al reaccionar con el N_2O_3 en la mezcla, da como producto el NO, como se observa en la reacción f.

El NO es la especie fundamental para el desarrollo del color característico de los cárnicos procesados al interactuar con la Mb presente en las carnes cuando se somete a un proceso térmico y en la ausencia de colorantes naturales o sintéticos obteniendo como resultado la coloración particular (tonalidades rojas o rosa) típica en las mortadelas, reacción g (Lopez F. & Ramirez Zelaya, 2014).

Una reacción adicional que ocurre en este proceso es la producción cíclica de nitritos teniendo como precursores el HNO_2 y HNO_3 , (reacción h). A partir de estos dos precursores como primer producto se obtienen iones nitrato que posteriormente se reducen a nitritos por medio de diferentes enzimas como la nitrato y nitrito reductasa presente en las mortadelas y/u organismo humano (Tarté, 2009), siendo esta la razón por la que en diferentes embutidos cuya formulación no incluyó sales de nitrato se encuentran trazas de este ion (Lugo, 2008).

El uso de nitrito en la industria debe ser de estricto control ya que algunos fabricantes han decidido desarrollar sus formulaciones directamente con esta sal, cloruro de sodio y trazas de colorante para obtener un producto con aspecto agradable y de confianza para el consumidor (Rada-Mendoza et al., 2016; Tarté, 2009). El suministro de sales a los embutidos desde décadas atrás ha preocupado a las entidades sanitarias por los posibles riesgos en la salud, por ello cada país posee restricciones propias frente al uso de sal de nitrito en los productos cárnicos procesados (Gallego Restrepo, 2013) como se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.

Concentraciones de sales de nitrito residual permitidas en embutidos en algunos países de alta demanda y Colombia.

País/Continente	Concentración (ppm)	Tipo de Producto
Estados Unidos de América	200	Productos Triturados
		Productos con adición de sales
		Productos Inyectados
Rusia	No permite el uso de sales nitradas en productos cárnicos	-
Europa	250	Carnes con adición de sales Tocino como NaNO ₂
Colombia	200	Ebutidos en general como NaNO ₂

Nota. Adaptado de (Tarté, 2009)

Es importante resaltar que los límites designados por cada país contemplan la adición de sal de nitrito y nitrato en su forma potásica y sódica, la cuantificación de ambas sales se expresa como nitrito de sodio residual (Tarté, 2009). Para el caso de Colombia, la Resolución 4125 del 5 de abril de 1991 y el decreto 2106 del 26 de julio de 1988 en el artículo 60, estipula que la cantidad máxima residual de nitrito de sodio y potasio es de 200 mg/kg. Concentraciones altas de nitrito residual pueden ser absorbidas por el organismo y reaccionar con la hemoglobina (disminuyendo la capacidad de transporte de oxígeno y por lo tanto impidiendo la oxigenación) o reaccionar con el ambiente químico del cuerpo, generando nitrosaminas (Hernandez Cázares, 2010). Por ello se busca disminuir gradualmente el uso de nitritos sin comprometer el papel que estos cumplen al inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, principalmente *Clostridium Botulinum* bacteria que genera el botulismo (Duarte et al., 2014; Torres G., 2017).

1.5 La Mb y su influencia en el color

La presencia característica, y más común, de especies derivadas de la Mb en las carnes, incluyendo los embutidos, son la oximioglobina (OMb) y la metamioglobina. Estas especies se encuentran en un equilibrio químico; sin embargo, tan pronto la carne se expone a un ambiente enriquecido con determinadas moléculas o compuestos como el oxígeno, la coloración se ve directamente afectada predominando la reacción mostrada en la Figura 4 (Goenaga Uceda, 2010; Oyagüe, 2007; Totosaus, Reyes L., & Pineda R, 2015).

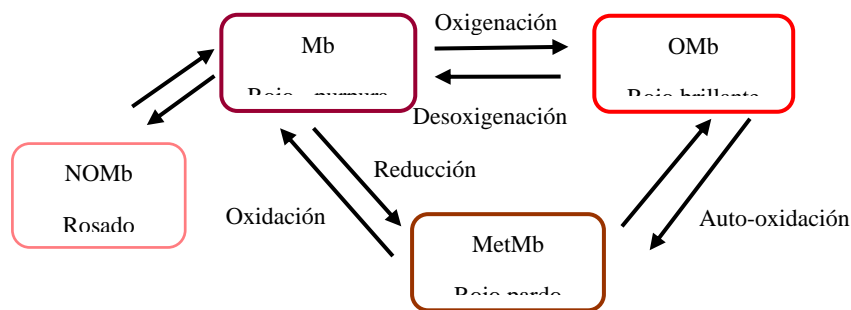


Figura 4. Reacciones químicas de equilibrio entre la mioglobina y sus derivados.

Nota: adaptación (Goenaga Uceda, 2010; Oyagüe, 2007; Reyes L. et al., 2015)

La cantidad de NO, proveniente de los nitritos, que reacciona con la Mb forma el derivado nitrosomioglobina (NOMb) compuesto que contribuye con la apariencia rosa atractiva de la mortadela.

La mioglobina es la principal descriptora de color en la carne al relacionarse con diferentes moléculas que poseen la capacidad para interactuar con el hierro (Fe) (II) presente en el característico grupo hemo de esta proteína. La coloración que puede observarse debido a estas relaciones puede variar entre gamas de rojo, rosado, café o verde, evidenciándose la oxidación del

Fe (II) a Fe (III) para algunas tonalidades. En diferentes ambientes químicos la Mb o deoximioglobina (rojo-purpura) puede formar diferentes derivados estructurales que se caracterizan por la tonalidad según sea la reacción como la OMb (roja) y MetMb (marrón) (Silverstein, Kirk, Meyer, & Holman, 2015). Estudios refieren y atribuyen la oxidación del nitrito a NO siendo la MetMb el catalizador en los músculos de organismos vivos (Silverstein et al., 2015; Wu et al., 2002).

La exposición a la luz, oxígeno o una alteración intencional de los cárnicos y el ambiente de almacenaje provoca que en el grupo hemo ocurra una disociación entre la Mb y el NO, consecuentemente el Fe se reduce de 3+ a 2+ exhibiéndose un color marrón característico. El NO es oxidado nuevamente a nitrito y/o nitrato si se expone a un ambiente rico en oxígeno (Cobos & Díaz, 2015).

1.5.1 Características de color según las especies derivadas de la mioglobina En la Tabla 2, se relacionan algunos de los cambios característicos de las diferentes formas de la mioglobina y el color característico (Zurbrigen, 2009). El desarrollo del color es primordial en los diferentes embutidos, algunos estudios establecen las reacciones que dan como resultado las diferentes tonalidades mostradas por la mioglobina cuando en su sitio activo se anclan diferentes moléculas como O₂ y NO; la presencia abundante de oxígeno permite que este se acople a la Mb convirtiéndose en OMb de tonalidad roja brillante. Por otra parte si la Mb se cuenta con un exceso de nitritos y oxígeno ésta se oxida y se transforma en MetMb con tonalidad marrón, este proceso se describe en la Figura 5 (Zurbrigen, 2009).

Tabla 2.

Característica de la mioglobina según el tipo de pigmento y color exhibido

Pigmento	Color	Estado de		
		Oxidación Fe	Estado mioglobina	Formación*
Mioglobina	Rojo Púrpura	II	Nativa	No Reducida
Oximioglobina	Rojo Brillante	II	Nativa	Oxigenación
Metamioglobina	Pardo	III	Nativa	Oxidación
Globinamiohemocromógeno	Rojo/Rosa	II	Desnaturalizada	Desecación Calor
Globinamiohemicromógeno	Pardo Grisáceo	III	Desnaturalizada	Oxidación
Nitrosomioglobina	Rojo	II	Nativa	Nitrosación
Nitrosometamioglobina	Rojo Luminoso	III	Nativa	Oxidación
Nitrosomiohemocromógeno	Rosa	II	Desnaturalizada	Calor
Nitrosomiohemicromógeno	Rosa Pardo/Rosa Grisáceo	III	Oxidación	Oxidación
Notrosil-hemocrómo	Rosa	II	-	Calor

Nota. * hace referencia a la transformación química de la Mb para dar origen a la especie. Fuente: adaptado (Zurbrigen, 2009).

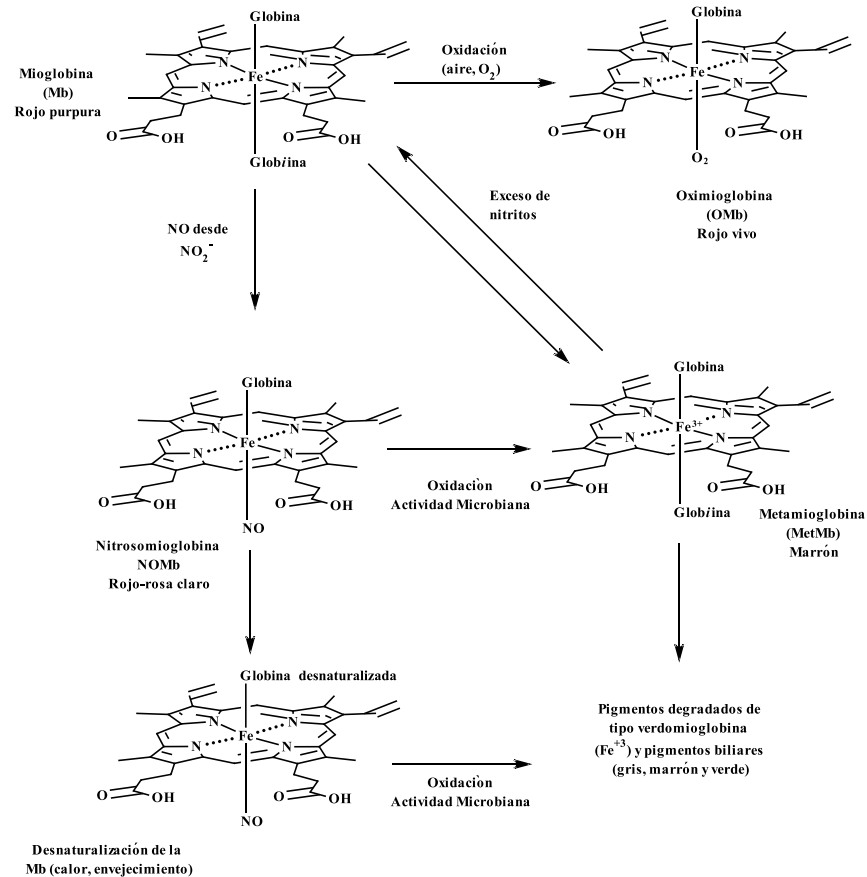


Figura 5. Desarrollo del color según las reacciones desarrolladas con la mioglobina.

Fuente: adaptado (Zurbrigen, 2009).

1.6 Antecedentes cuantificación de nitritos en embutidos

El seguimiento de la concentración de nitritos en los alimentos procesados es de gran importancia; existen diversas técnicas como la espectrofotometría UV-vis, siendo hoy día la principal técnica avalada por el CODEX a nivel mundial y la NTC 1325 en Colombia para la detección y control de nitritos en productos embutidos (Huanca & Solis, 2010; Lopez F. & Ramirez Zelaya, 2014; Rada-Mendoza et al., 2016; Vargas Velásquez et al., 2014; Wang et al., 2017; Zurbrigen, 2009). Así mismo, diferentes autores reportan dentro de sus investigaciones la

cuantificación de nitritos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, CLAE (HPLC por sus siglas en inglés) (Fernández S., García M., & Fuentes L., 2014; Flores, Zalazar, Ayala, Hernaez, & Figueroa, 2016; Wang et al., 2017). En la Tabla 3, se describen algunos autores que han centrado sus investigaciones en la cuantificación de nitritos y la técnica utilizada.

Tabla 3.

Autores con investigaciones basadas en la determinación de nitritos.

Autor	Método	Analito	Condiciones del Método
Vargas Velásquez et al. (2014)	Espectroscopia UV-vis	Nitritos	Lectura a 474 nm
Rada-mendoza et al. (2016)	Espectroscopia UV-vis	Nitritos	Según ISO 2918-1975
Lopez F. & Ramirez Zelaya. (2014)	Espectroscopia UV-vis	Nitritos	Lectura a 540 nm
Huanca & Solis. (2010)	Espectroscopia UV-vis	Nitritos	Lectura a 538 nm
Zurbrigen. (2009)	Espectrometría de Reflectancia	Color	Sistema tridimensional esférico, Espacio de Color CIELAB
Flores et al. (2016)	Cromatografía Líquida de alta eficiencia	Nitratos y Nitritos	Columna Zorbax Eclipse XDBC8, 4,6 mm x 150 mm x 5 µ, flujo de 1 mL/min, inyección de 100 µL, temperatura del horno de 35 °C y longitud de onda de detección de 221 nm
Fernández S. et al. (2014)	Cromatografía Líquida de alta eficiencia	Nitratos y Nitritos	Columna C18 (detección a 214 nm); elución con una fase móvil de la solución tampón de K ₂ HPO ₄ (Lechu 5 mM y KH ₂ PO ₄ 25 mM pH=3 a ga) un flujo de 1 mL/min.

La cuantificación de nitritos en Colombia se ha evaluado principalmente por espectroscopia ultravioleta visible, para el Ministerio de Salud e INVIMA, y a nivel industrial es la técnica avalada para hacer el seguimiento de este tipo de sustancias durante el proceso de fabricación de diferentes alimentos que requieren cuantificar nitritos antes de la comercialización en el país. El uso de esta técnica requiere un pretratamiento de la muestra para la extracción del nitrito y adicional una reacción colorimétrica con el reactivo de GRIESS para su detección. Su cuantificación está regida bajo la Norma Técnica Colombiana NTC 4565, “*Carne y Productos Cárnicos. Método para Determinar el Contenido de Nitrito (Método de Referencia.)*”.

1.6.1 Espectroscopía UV-vis y reacción de GRIESS La espectroscopía UV-vis dentro de las diferentes formas de radiación comprende una pequeña porción del espectro electromagnético de 100 nm a 750 nm. La técnica se basa en medir la intensidad de color resultante de la incidencia de luz en el rango visible entre 380 nm y 750 nm. Las moléculas absorben la energía irradiada desde la lámpara causando la transición entre los diferentes niveles de energía disponibles, la longitud de onda incidida sobre la molécula debe tener la intensidad adecuada para desplazar los electrones entre los diferentes niveles. En moléculas orgánicas la presencia de grupos cromóforos permite observar el desplazamiento electrónico y la respuesta emitida se da en una longitud de onda característica denominada máximo de absorbancia; sin embargo, la posición del máximo de absorbancia puede presentar un desplazamiento longitudinal por el entorno o la presencia de otros grupos cromóforos, por esto la técnica requiere el uso de patrones de los compuestos que se están cuantificando para correlacionar la identidad de la señal emitida por el espectrofotómetro (Owen, 2000).

El proceso colorimétrico que se evidencia en la reacción de Griess para la cuantificación de nitrito presenta claramente el principio de esta técnica. La sulfanilamida presente en la solución de Griess reacciona con el ion nitrito en medio ácido para formar la sal de diazonio, esta sal en presencia de N-(1-naftil)-etilendiamina reacciona formando el colorante azo rosa que caracteriza a la reacción como se observa en la Figura 6 (b), la intensidad del color observado está directamente ligada a la concentración de iones nitrito que reaccionaron para formar el diazo compuesto Figura 6 (a) (Castañeda et al., 2010; Tenorio López, Del Valle M, & Pastelín H, 2005).

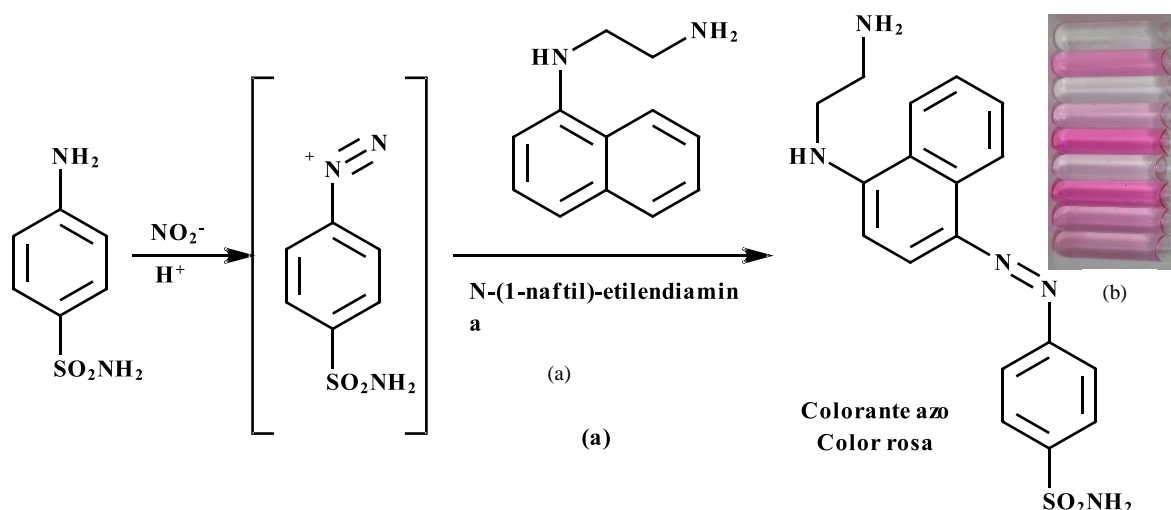


Figura 6. (a) Mecanismo de la reacción de GRIESS. (b) Visualización de la reacción de Griess con diferentes concentraciones o ausencia de NO_2^- .

Los diferentes grupos cromóforos presentes en el colorante azo formado cuando son incididos por la luz del espectrofotómetro absorben la energía recibida y excita los electrones que tengan la capacidad para pasar desde niveles σ y/o π a niveles π^* , estos cambios energéticos son los recibidos en el detector y representan la disminución del color verde en la longitud de onda que se absorbe entre 500 y 560 nm. El color complementario emitido, rosado, es representado en el espectro de

luz visible con un máximo de absorbancia a 520 nm (Owen, 2000; Skoog, West, Holler, & Crouch, 2013).

1.7 Sistema RGB y el color en mortadelas

La exhibición de un producto con buena apariencia y coloración está ligado a la incidencia de la luz y la concentración de compuestos a los que se expone o están presentes en los diferentes alimentos (Goenaga Uceda, 2010). Para el caso de los cárnicos existen diferentes colores que a la vista y gusto del hombre se traducen en un buen estado o mal estado de la carne (Viriyarattanasak, Hamada-Sato, Watanabe, Kajiwara, & Suzuki, 2011); sin embargo, químicamente los colores exhibidos se dan según la naturaleza de las moléculas presentes o que se forman en el ambiente químico en el que se encuentra la Mb de la carne. El color en los embutidos y alimentos en general puede determinarse mediante diversos métodos entre los cuales se destacan los colorimétricos, espectrofotométricos, cartas de color, imágenes hiper-espectrales y técnicas variacionales como la visión digital (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014)

Existen diferentes formas de registrar los colores, uno de los sistemas establecidos para el registro de coordenadas es el sistema RGB (rojo, verde y azul por sus siglas en ingles). El sistema RGB se basa en la percepción que tiene el ojo humano y la combinación de los colores primarios de luz rojo, verde y azul. Este sistema es representado por un sistema de coordenadas cartesianas donde el punto (0,0,0) representa el color negro y el punto (255,255,255) el color blanco, a través del cubo que se forma se dispersan las diferentes variedades que se puedan encontrar desde la combinación de los tres colores, representado cada uno por un eje (Figura 7). Según el color analizado mediante el sistema RGB se obtendrá un valor de intensidad para cada uno de los ejes

R, G y B. El sistema RGB ha sido implementado en diferentes campos de aplicación, donde se resalta la espectrofotometría (Becerra Navas, Silva Silva, & Javier, 2018; Gonçalves, Serpa, Cunha, Gouveia, & Maciel, 2014).

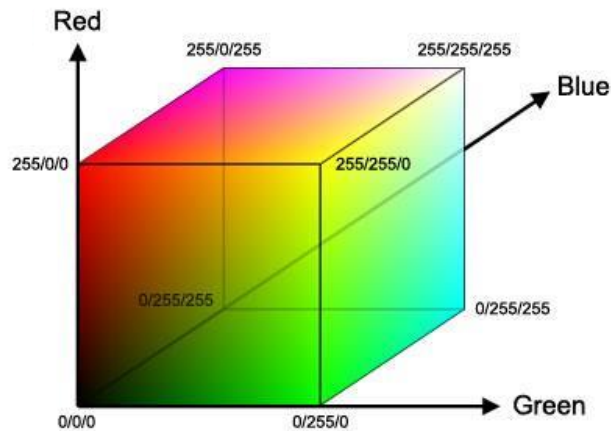


Figura 7. Representación del sistema RGB.

Nota: Adaptado de (Gonçalves et al., 2014)

2. Metodología

2.1 Proceso de fabricación de una mortadela

Las mortadelas analizadas en este trabajo fueron elaboradas en la planta de cárnicos del Centro de atención al sector agropecuario C.A.S.A. del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA ubicado en la sede de Guatiguará. La formulación base utilizada fue la estandarizada por el SENA y descrita en la Tabla 4.

Tabla 4.

Ingredientes empleados para la formulación de las mortadelas formuladas.

Ingredientes	Cantidad (g)
Carne de res	1800
Carne de cerdo	900
Tocino o grasa de cerdo	300
Cloruro de sodio (sal común)	45
Condimentos para embutidos tipo mortadela	39
Agua/ hielo	600
Polifosfatos	19
Almidón de yuca	185
Soja	75
Humo negro	21
Nitrito de sodio	Según diseño experimental
Eritorbato de sodio	Según diseño experimental
Colorante	-

En el proceso de elaboración de las mortadelas se tuvo en cuenta las etapas del proceso descritas en la Figura 8.

Con el bache ya homogenizado se dividió la pasta en porciones de 300 g y a cada una de éstas, se le adicionaron las cantidades planteadas en el diseño experimental descrito en la Tabla 5. En el proceso normal de producción después de la soja, se adiciona el nitrito de sodio, eritorbato de sodio y colorante antes de retirar la pasta del cutter; sin embargo, como se trabajaron diferentes formulaciones por cada 300 mg de carne no se pudo hacer el mezclado directamente en el equipo. En lo que respecta al colorante, que se adiciona normalmente en la

formulación del SENA, se decidió no adicionarlo para observar las tonalidades dadas directamente por el nitrito de sodio sin la acción de un agente adicional.

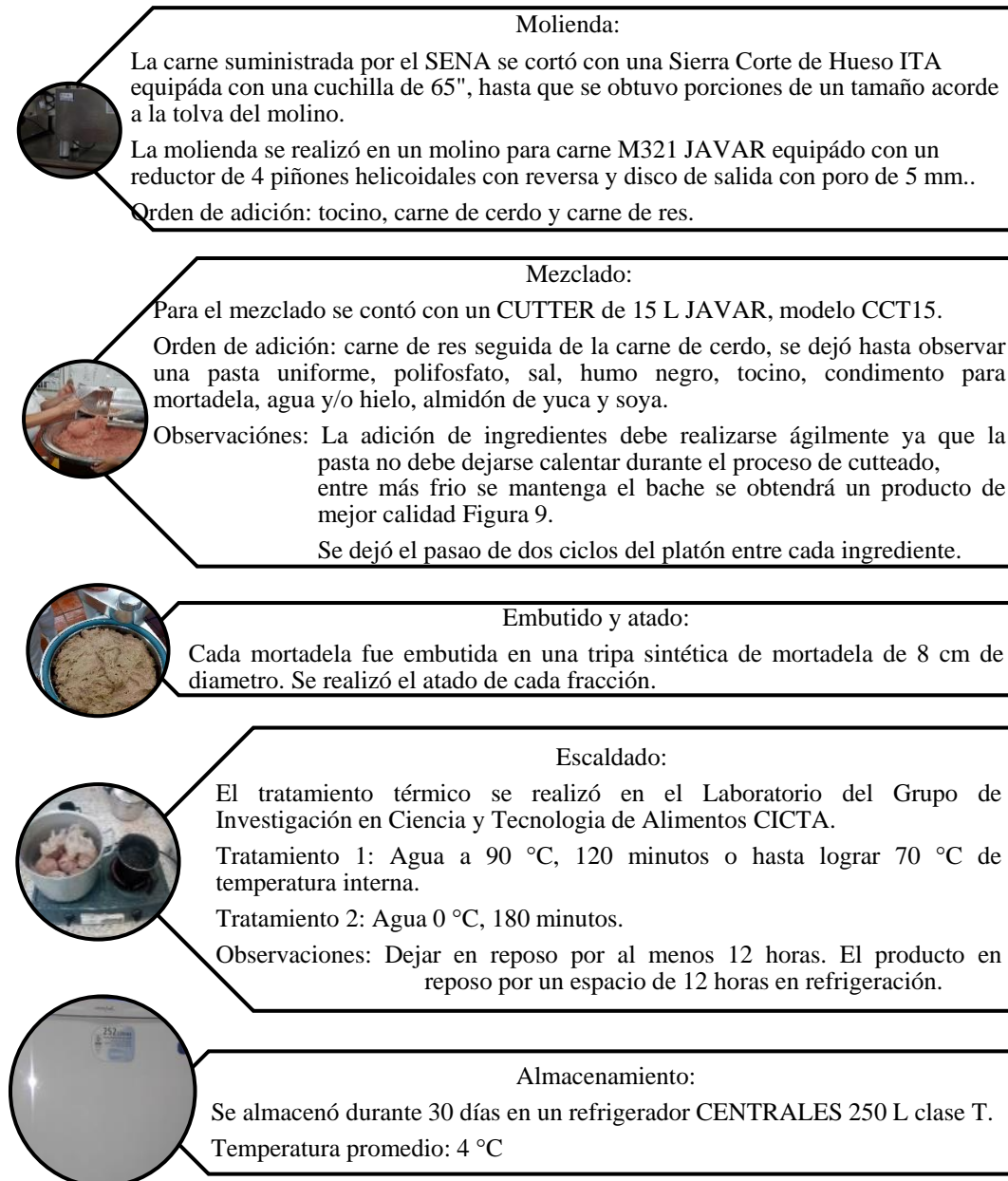


Figura 8. Diagrama para el proceso de manufactura de mortadela.



Figura 9. Proceso de mezclado o cutteado para la obtención de la pasta.

2.2 Diseño experimental para la formulación de mortadelas con concentración variable de nitrito de sodio y eritorbato de sodio

Las cantidades planteadas para adicionar de nitrito de sodio y eritorbato de sodio a la formulación de mortadela se realizaron mediante un diseño experimental 2^2 centrado en las caras usando el software MINITAB versión 17, donde las variables se trabajaron en mg/kg. La Tabla 5 contiene los experimentos establecidos por el diseño experimental, tomando como variables de respuesta la concentración de nitrito residual y el color.

Tabla 5.

Diseño experimental

Mortadela	Concentración de nitrito de sodio adicionado mg/kg	Concentración de eritorbato de sodio adicionado mg/kg
Mortadela 1	200	500
Mortadela 2	50	500
Mortadela 3	125	250

Mortadela	Concentración de nitrito de sodio adicionado mg/kg	Concentración de eritorbato de sodio adicionado mg/kg
Mortadela 4	200	0
Mortadela 5	50	250
Mortadela 6	200	250
Mortadela 7	125	0
Mortadela 8	125	500
Mortadela 9	50	0

2.3 Cuantificación de nitritos

Para la determinación de la concentración de nitritos en mortadelas se utilizó la técnica analítica espectroscopia UV-vis. El método que se utilizó ha sido implementado y estandarizado en el Laboratorio de Alimentos CICTA-UIS basándose en la AOAC 973.31 con algunas modificaciones. La cuantificación se realizó los días 1, 2, 3, 8, 15 y 30, tiempo máximo permitido para la caducidad de una mortadela en Colombia. Se verificó que cada una de las mortadelas cumpliera con la norma estipulada para la concentración de nitritos residuales permitida descrita en la Tabla 1 del apartado 1.5.

2.3.1 Preparación de la muestra y lectura por Espectroscopía UV- vis Se tomaron 10 g de mortadela en 100 mL de agua destilada a 70 °C, el recipiente se llevó a un baño de agua hirviendo durante 15 min y se agitó ocasionalmente. Una vez la mezcla estuvo fría, se adicionaron 5 ml de sulfato de zinc heptahidratado 0,4 M y 2 ml de hidróxido de sodio al 2% p/v para la precipitación de proteínas, posteriormente se aforó en un balón de 200 mL y se dejó reposar por 30 minutos. A los 30 minutos se filtró la solución previamente decantada. De la solución obtenida se tomaron

alícuotas de 5 mL y se le adicionaron 0,2 mL del reactivo GRIESS-ILOSVAY distribuido por MERCK MILLIPORE, se permitió el desarrollo del color por un periodo 60 minutos. La cuantificación de nitritos se realizó por espectrofotometría UV-vis.

Se fijó una longitud de onda de 520 nm en el espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC MULTISKAN GO con lámpara de xenón, paso óptico de 1 nm, fotodiodos como detector y software SkanIT RE versión 4.1. Se midió un blanco, en una placa de 96 pozos con capacidad de 400 μ L por pozo, cuya composición consistió en agua destilada y 0,2 mL de reactivo de GRIESS. Finalmente, los resultados se expresaron como mg de nitrito/kg. El análisis de cada muestra se desarrolló por triplicado.

2.3.2 Preparación de la curva de calibración de nitritos La curva de calibración de nitritos se realizó tomando varios volúmenes de una solución patrón de nitrito de sodio de 5 ppm y aforando a 100 mL para obtener los puntos de la curva descritos en la Tabla 6.

Tabla 6.

Curva de calibración para nitritos.

Volumen (mL)	2	4	10	20	30
Concentración [M]	0,1	0,2	0,5	1	1,5

La ecuación obtenida desde la curva de calibración fue usada para determinar las concentraciones en mg/kg de nitrito residual de cada una de las mortadelas analizadas.

2.3.3 Análisis de concentración de nitrito residual Se determinó el valor de la pendiente para cada mortadela formulada para establecer el cambio de la concentración de nitrito residual entre

el día 1 y el día 2. A su vez se compararon los resultados obtenidos para las mortadelas con igual cantidad de nitrito de sodio inicial y los puntos extremos (0 y 500) de eritorbato de sodio adicionado. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las mortadelas formuladas se aplicó la prueba estadística ANOVA de una variable Tukey.

2.4 Evaluación de color

2.4.1 Registro Fotográfico Cada una de las muestras de mortadela fueron retratadas con una cámara fotográfica SONY CYBER SHOT modelo DSC-w630/B con resolución de 16.1 mega pixeles, la imagen resultante se procesó mediante el software IMAGEJ para obtener las coordenadas RGB del color de cada una de las mortadelas. Cada una de las fotografías se tomó en las mismas condiciones de exposición de luz, para ello se dispuso de una caja aislada de la luz del medio (Figura 10) donde se ubicó la muestra y se expuso a luz blanca emitida por una lámpara fluorescente de 5 w. A su vez la cámara fotográfica usada fue la misma en cada una de las tomas, sin uso de flash y la distancia de la muestra al lente de la cámara, fue la misma en todos los casos.

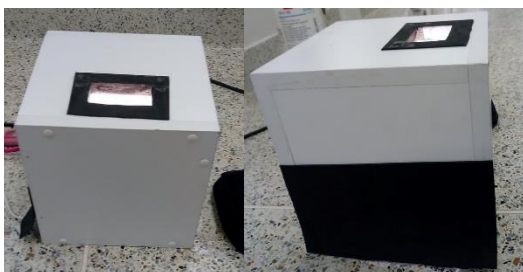


Figura 10. Caja aislada de la luz del medio para el registro fotográfico.

2.4.2 Análisis RGB

2.4.2.1 Descenso de color La variación de color RGB entre el día 1 y 30 se graficó en un diagrama radial con los respectivos colores RGB obtenidos por el software IMAGEJ para cada mortadela.

2.4.2.2 Variación de color en la coordenada R Se realizó el seguimiento del cambio de la tonalidad roja para la coordenada R (rojo) según Becerra Navas et al., (2018), las coordenadas G y B se tomaron con un valor de cero para observar el desplazamiento a través del eje X o R. Se halló el porcentaje de pérdida de color en los 30 días normalizando los valores de R para cada una de las mortadelas analizadas.

3. Resultados y Discusión

3.1 Cuantificación de nitrito residual

Mantener una concentración de nitrito residual baja en las mortadela y embutidos en general, según la OMS, es ideal en este tipo de productos ya que una concentración elevada de nitrito favorece en el ambiente de las mortadelas o el cuerpo humano la formación de nitrosaminas; compuestos asociados a diversas enfermedades (Alvarado A. & Esquivel L., 2016; Lopez F. & Ramirez Zelaya, 2014; Ventanas et al., 2004)

En la Tabla 7, se presentan los valores resultantes del análisis de nitrito residual en las formulaciones de mortadela descritas en la Tabla 5, durante el tiempo de almacenamiento, además se relaciona el cambio de la concentración de nitrito residual en los días 1 y 2 dado que en este periodo de tiempo se presenta la mayor variación.

Tabla 7.

Concentraciones de nitrito de sodio residual para las mortadelas analizadas

Mortadela N°	Formulación		Concentración de nitrito residual [mg/kg] en los días de muestreo						Pendiente días 1 y 2
	NO ₂ ⁻ [mg/kg]	C ₆ H ₇ NaO ₆ [mg/kg]	1	2	3	8	15	30	
Mortadela 1	200	500	64,79	26,57	22,55	22,70	21,81	16,09	38,22
Mortadela 2	200	0	71,54	31,08	23,82	25,21	22,95	16,71	40,46
Mortadela 3	50	500	40,55	15,88	15,85	14,68	14,96	14,75	24,67
Mortadela 4	200	250	74,43	31,50	25,01	24,58	21,81	15,02	42,93
Mortadela 5	50	250	44,10	16,35	15,93	15,70	14,95	14,76	27,75
Mortadela 6	125	250	49,47	20,08	17,89	17,47	17,16	15,36	29,39
Mortadela 7	125	0	60,34	20,14	20,51	19,40	14,98	18,87	40,2
Mortadela 8	125	500	57,60	17,75	18,28	19,89	13,34	18,26	39,85
Mortadela 9	50	0	44,51	16,16	19,71	18,51	15,26	14,59	28,35

* mg*kg⁻¹*d⁻¹

Durante todo el periodo de análisis la concentración de nitrito residual de todas las mortadelas formuladas cumplió lo estipulado en la Resolución 4125 de 1991, ninguna excedió la concentración máxima permitida (200 mg/kg). Los valores de nitrito residual se mantuvieron entre 40 mg/kg y 74 mg/kg, y fueron similares a las concentraciones reportadas por Vargas Velásquez et al., (2014) y López F. & Ramírez Zelaya, (2014) quienes encontraron valores entre 29 y 70 mg/kg de nitrito residual en mortadelas comerciales.

La variación de la concentración de nitrito residual, de forma general, tendió a disminuir con el paso del tiempo, siendo más acelerada entre el día 1 y 2 con respecto a los demás días de análisis, a consecuencia de la interacción entre la Mb y el nitrito transformado a NO; no obstante, algunas mortadelas presentaron concentraciones fluctuantes en los diferentes días de análisis, alterando la tendencia de degradación, por la constante disociación del NO en el nitrosopigmento (NOMb), la liberación de NO como gas y la regeneración de NO en el ambiente de cada una de las mortadelas (Duvé Pérez & Robles Andújar, 2000).

Las mortadelas que mostraron un menor cambio, entre el día 1 y 2, fueron la 3, 5, 6 y 9, cuyas velocidades de descenso fueron 24,67, 27,75, 29,39 y 28,35 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ de nitrito de sodio residual. De acuerdo con Alvarado & Esquivel (2016) el descenso en la concentración de nitrito se asocia con la oxidación y gasto del NO_2^- para producir el NO que se coordina en el sitio activo de la Mb dando el color rosa en las mortadelas al formar el pigmento NOMb (Alvarado A. & Esquivel L., 2016).

En la Figura 11, se representa la evolución del nitrito residual durante el tiempo de almacenamiento, observándose que en todos los casos; existen diferencias significativas en la concentración de nitrito residual de las formulaciones evaluadas.

Para las mortadelas 1 y 2, las cuales fueron formuladas con la misma concentración de nitrito de sodio (200 mg/kg), pero concentraciones de eritorbato de 0 y 500 mg/kg, punto mínimo y máximo respectivamente del diseño experimental (Tabla 7), se evidenció que conforme la concentración de eritorbato de sodio aumenta la concentración de nitrito residual disminuye. Este comportamiento es similar al reportado por Ayala *et al.* (2016) para el ácido ascórbico, dado que ellos al modificar la concentración del ácido de 0,25 a 0,75 g/kg observaron una disminución de la concentración de nitrito residual de 0,41 mg/kg a 0,04 mg/kg. Con el eritorbato de sodio (sal del

ácido ascórbico) no se han realizado estudios que permitan evaluar su comportamiento en presencia de nitrito de sodio, siendo este trabajo pionero en este aspecto.

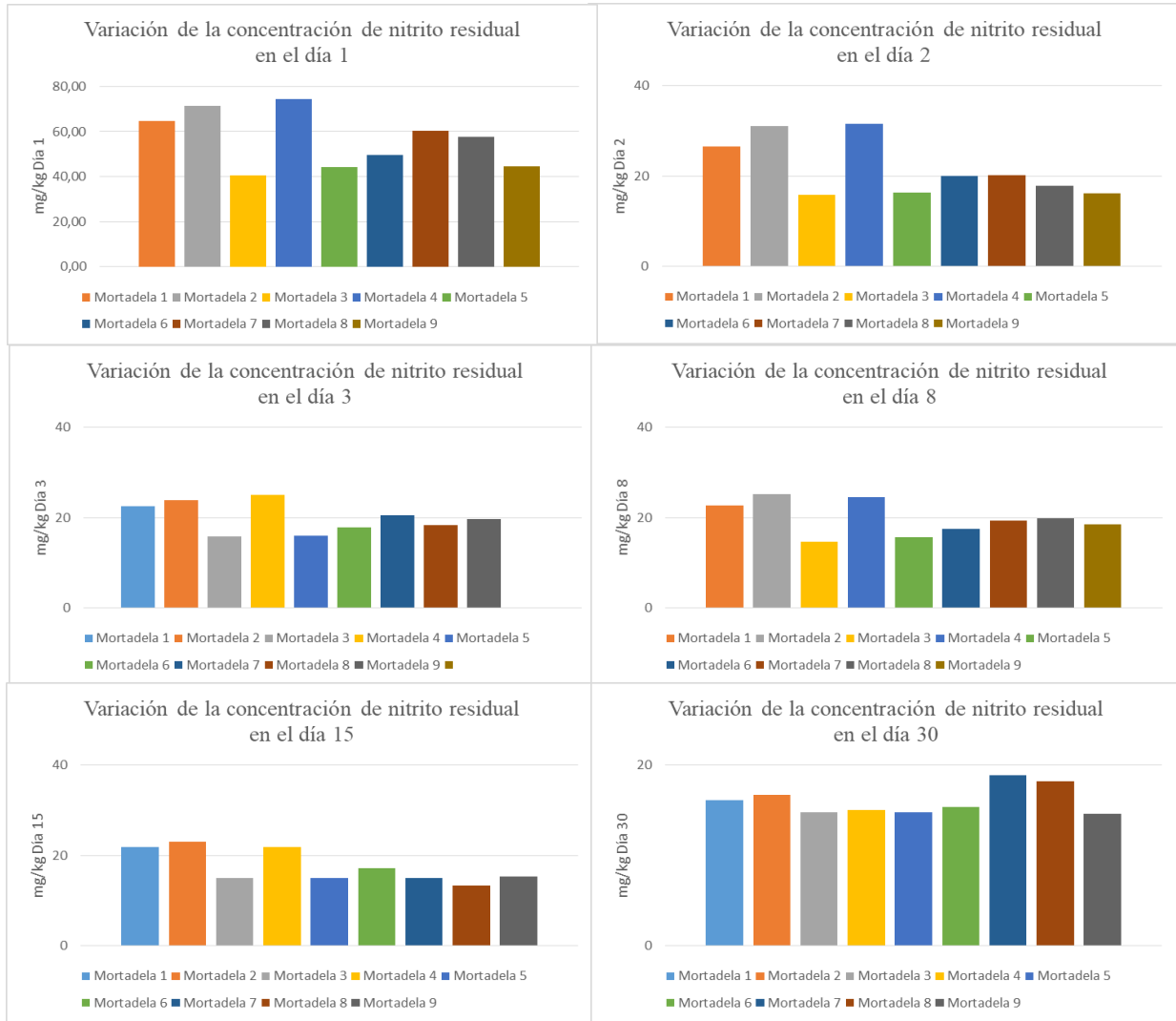


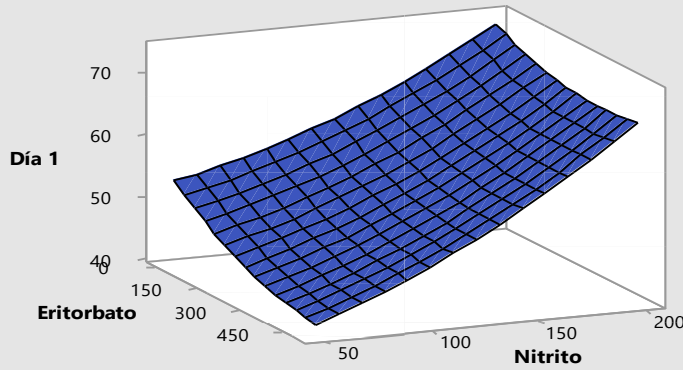
Figura 11. Concentración de nitrito residual para cada una de las mortadelas formuladas. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

En la Figura 12, se muestran los resultados asociados con el efecto de la concentración de nitrito de sodio y de eritorbato de sodio, sobre la concentración de nitrito residual en mortadelas. De acuerdo con ellos, las concentraciones de nitrito de sodio y eritorbato de sodio que minimizan en

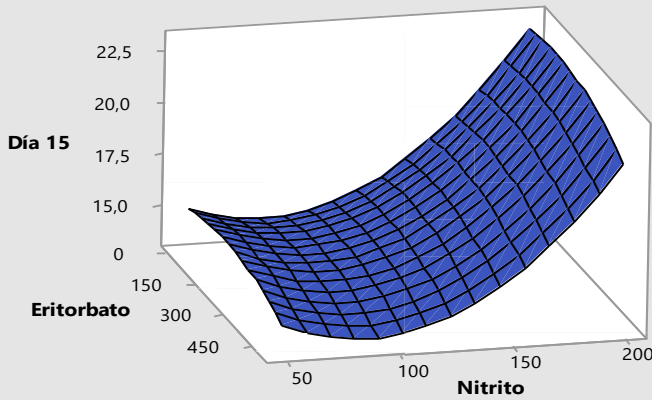
el día uno (1) la concentración de nitrito residual (40,55 mg/kg), corresponden a 50 mg/kg de nitrito de sodio y 500 mg/kg de eritorbato de sodio es decir a la formulación de la mortadela 3. Sin embargo, conforme aumenta el tiempo de almacenamiento la concentración óptima según el modelo de superficie de respuesta varía de modo que, para el día 15 estas concentraciones corresponden a de 89 mg/kg de nitrito de sodio y 500 mg/kg de eritorbato de sodio; y para el día 30 a 50 mg/kg de nitrito de sodio y 248 mg/kg de eritorbato de sodio. En estas condiciones las concentraciones de nitrito residual predichas para los días mencionados son de 13,6 y 13,7 mg/kg de nitrito residual respectivamente. Lo anterior indicaría que independiente de la cantidad inicial de nitrito de sodio y eritorbato de sodio, la concentración de nitrito residual entre los días 15 y 30 tiende a mantenerse.

La apreciación mencionada se corrobora en la Figura 13 en donde a manera de ejemplo, se muestra la evolución de la concentración de nitrito residual con el tiempo de almacenamiento, en las mortadelas 1, 3 y 6, mortadelas, que tienen diferente concentración inicial de nitrito de sodio. Inicialmente y durante los dos primeros días se aprecia un descenso marcado en la concentración de nitrito residual; después del segundo día, las concentraciones de nitrito residual se estabilizan en valores cercanos a 15 mg/kg; este comportamiento es similar al descrito por Ayala (2016) en su investigación para el ácido ascórbico y se aprecia en todas las formulaciones desarrolladas, tal como se muestra en el Apéndice B.

Gráfica de superficie de Día 1 vs. Nitrito. Eritorbato



Gráfica de superficie de Día 15 vs. Nitrito. Eritorbato



Gráfica de superficie de Día 30 vs. Nitrito. Eritorbato

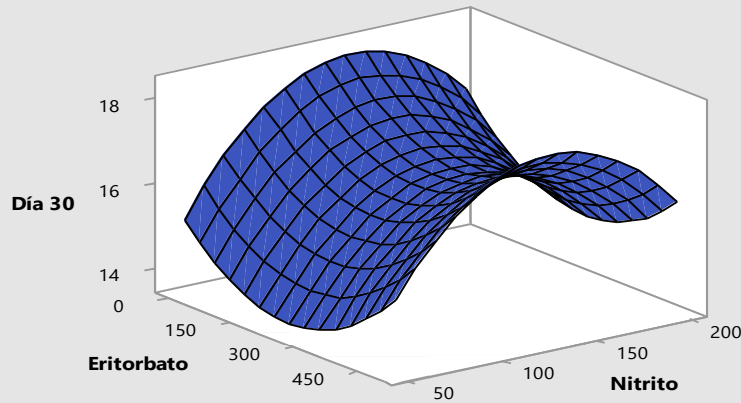


Figura 12. Efecto de la concentración de nitrito de sodio y eritorbato de sodio, sobre la concentración de nitrito residual en mortadela (día 1 de formulación).

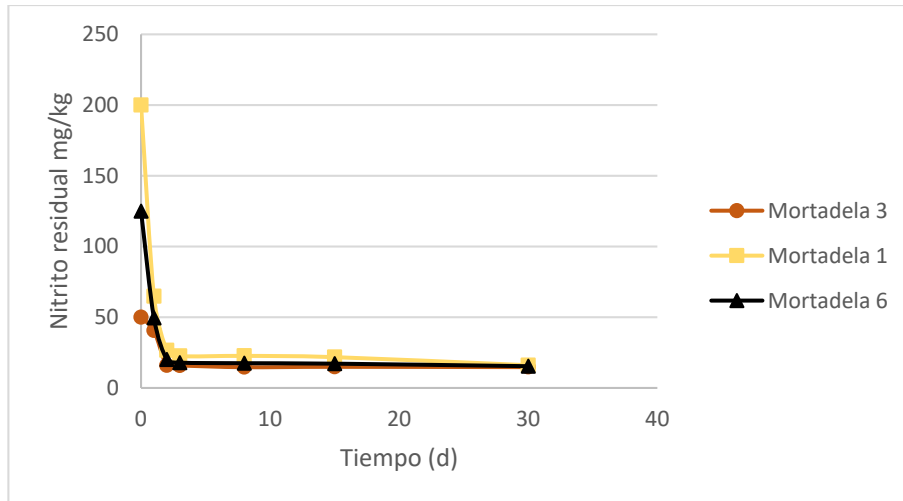


Figura 13. Concentración de nitrito residual para las mortadela 1 (formulación inicial nitrito de sodio:eritorbato de sodio 50:500 mg/kg), mortadela 3 (formulación inicial nitrito de sodio:eritorbato de sodio 200:500 mg/kg) y mortadela 6 (formulación inicial nitrito de sodio:eritorbato de sodio 125:250 mg/kg).

De acuerdo con los anteriores resultados, cualquiera de las formulaciones cumpliría con los límites permisibles de la legislación vigente en Colombia; sin embargo, las formulaciones de las mortadelas 3, 5, 6 y 9 se prefieren porque en ellas se usan menores cantidades de nitrito de sodio inicial y el nitrito residual para el día uno de análisis fue inferior a 50 mg/kg.

3.2 Evaluación de la variación del color rojo (R) con las formulaciones de mortadela.

Para evaluar el impacto de la formulación de las mortadelas sobre el color de la misma, los datos obtenidos en el diseño experimental presentados en la Tabla 8 fueron analizados utilizando como variable respuesta el color, considerándose como óptima la formulación que provea la mayor intensidad en el color y estabilidad en el tiempo.

Las mortadelas ensayadas se evaluaron en la escala de color RGB, y en todas como se muestra en la Tabla 8, se evidenció un desplazamiento hacia el negro o coordenada (0, 0, 0); es decir, que se visualizó la formación de una tonalidad parda con el tiempo. Esta tendencia puede atribuirse a la presencia de la MetMb según lo señalado por Goenaga Uceda (2010).

Tabla 8.

Valores en R para las mortadelas analizadas

Mortadela N°	Formulación		Color (coordenada R)					
	NO ₂ ⁻ [mg/kg]	C ₆ H ₇ NaO ₆ [mg/kg]	1	2	3	8	15	30
Mortadela 1	200	500	173	150	128	122	108	83
Mortadela 2	200	0	152	149	150	130	125	99
Mortadela 3	50	500	166	152	141	127	113	69
Mortadela 4	200	250	162	158	147	128	121	52
Mortadela 5	50	250	134	133	130	113	111	100
Mortadela 6	125	250	161	159	141	138	115	93
Mortadela 7	125	0	150	142	126	112	103	75
Mortadela 8	125	500	168	156	140	137	107	76
Mortadela 9	50	0	154	140	122	107	96	42

Los datos analizados por la metodología de superficie de respuesta y reflejados en la Figura 14, permiten establecer que la concentración en donde se maximiza el color, en los días 1 y 15, corresponde a la formulación de la mortadela 1 que contiene 200 mg/kg de nitrito de sodio y 500 mg/kg de eritorbato de sodio. En los tiempos señalados la pérdida de color para esta formulación corresponde a un 38% y 52% respectivamente, valores que evidencian una baja estabilidad del pigmento xxx en tiempo superiores a 15 días.

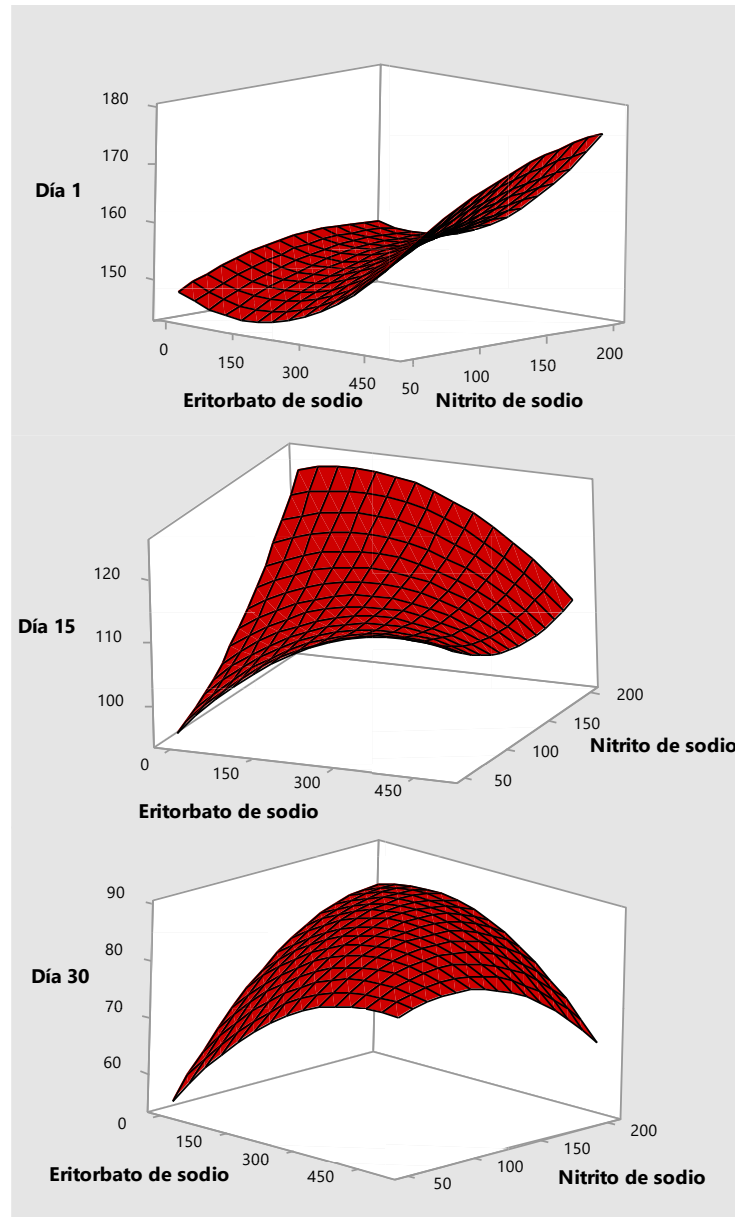


Figura 14. Efecto de la concentración de nitrito de sodio y eritorbato de sodio, sobre el color en la coordenada R en mortadela.

Los registros fotográficos para la mortadela 1 se observan en la Tabla 9, y la variación de color RGB del día 1 al 30 en el gráfico de contorno, Figura 15, donde el contorno exterior describe el color RGB en el día 1 y el contorno interior el color RGB en el día 30; la disminución del área

encerrada por los contornos confirmó un desplazamiento del color hacia el negro en la mortadela 1. Los diagramas de contorno para las demás mortadelas se registran en el apéndice B.

Tabla 9.

Registro fotográfico mortadela 1.

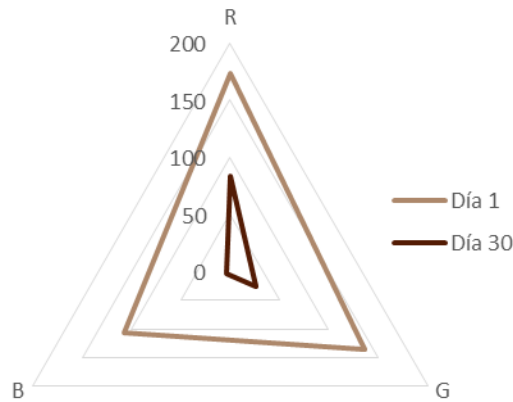


Figura 15. Gráfico de contornos para la evolución del color de la mortadela 1.

Los valores de R para la mortadela 1 variaron entre 173 y 83 como se muestra en la Figura 16, en la cual cada barra representa el tono rojo en la escala RGB en cada día de análisis. En esta grafica se observa que el color Rojo disminuye con el transcurso del tiempo de almacenamiento, corroborando el desplazamiento de los tonos hacia el negro o coordenada (0, 0, 0).

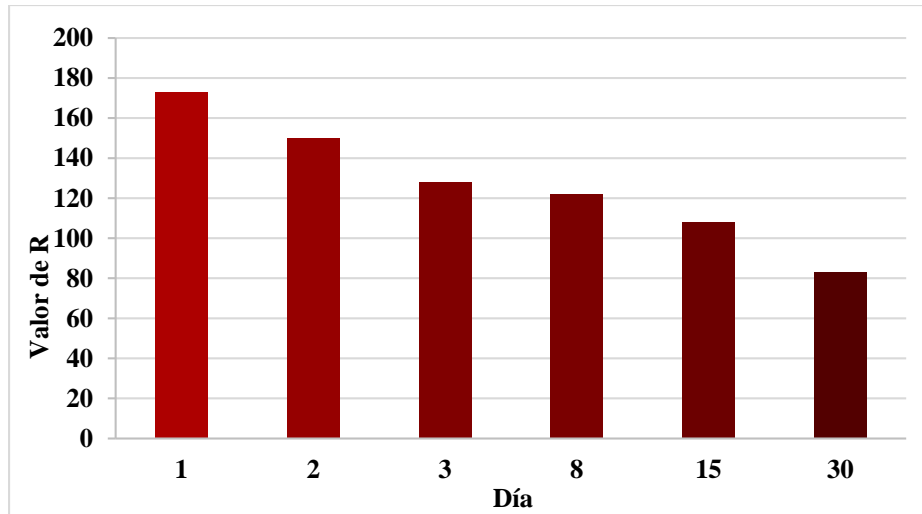


Figura 16. Evolución de la coordenada R en el cubo RGB Mortadela 1 NO_2 :200 - $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$:500.

Cuanto más alto es el valor de R más se favorece la tonalidad rosa en la mortadela, lo cual indica mayor formación de NOMb, pigmento asociado a el color rosado de estos productos (Oyagüe, 2007). Del mismo modo, se tiene un tono más atractivo para el consumidor (Viriyarattanasak et al., 2011).

En cuanto a la estabilidad del color al cabo de 30 días, se encuentra que la menor pérdidas relativa de color (%) de las mortadelas para el día 15 y día 30, se da para la formulación 5 (Tabla 10), sin embargo, la intensidad de color de esta mortadela varía entre 134 y 100, lo cual indica una alta concentración de MetMb y la generación de colores pardos que afectan las características organolépticas del producto.

Tabla 10.

Degradación del color en el día 30 (%).

Mortadela	% de pérdida de color	
Mortadela 1	38	52
Mortadela 2	18	35
Mortadela 3	32	58
Mortadela 4	25	68
Mortadela 5	17	25
Mortadela 6	29	42
Mortadela 7	31	50
Mortadela 8	36	55
Mortadela 9	38	73

Con respecto a la estabilidad del color en el tiempo se encontró que la mortadela 5 (50 mg/kg de nitrito de sodio y 250 mg/kg de eritorbato de sodio) perdió un 17% y 25% de color, al cabo de 15 y 30 días respectivamente; mientras que la mortadela la 1 (200 mg/kg de nitrito de sodio y 500 mg/kg de eritorbato de sodio), un 38% y 52%.

El diagrama de contorno para las mortadelas 5 se observa en la Figura 17. La diferencia entre contornos es inferior respecto a la mortadela 1 (Figura 15); indicando que estas formulaciones son más estables en color a través del tiempo de análisis; por lo tanto la mortadela 1 se descarta como una formulación adecuada para mantener la estabilidad del color en el tiempo.

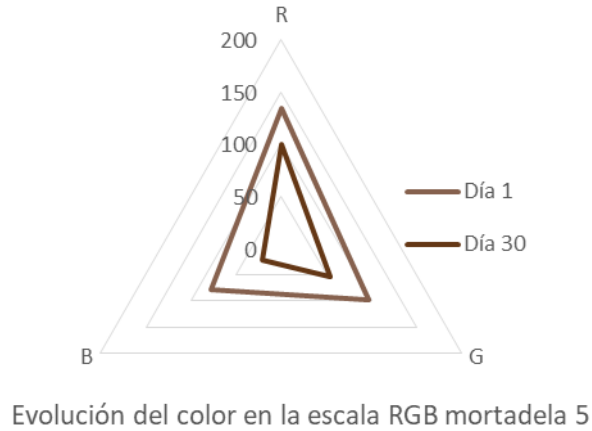


Figura 17. Gráfico de contornos para la evolución del color de la mortadela 5 y 6.

El registro fotográfico de las mortadelas 5 se presenta en la Tabla 11; el cambio de color que se observa está asociado a la formación de MetMb donde el hierro se oxida de +2 a +3, dando paso a la evolución de pigmentos pardos oscuros en la mortadela (Cobos & Díaz, 2015).

Los gráficos de descenso en R para las demás mortadelas se visualizan en el apéndice C).

Tabla 11.

Registro fotográfico mortadela 5 y 6.



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la concentración de nitrito residual, la intensidad de color y la estabilidad del color en el tiempo, se encuentra que ninguna de las formulaciones ensayadas cumple con los tres requisitos ideales para un producto como la

mortadela, es decir: concentración de nitrito residual, intensidad y estabilidad del color. En la tabla 12 sin embargo, se señalan las formulaciones con las cuales se lograron los mejores resultados para cada uno de los parámetros analizados.

Tabla 12.

Mortadelas con mejor comportamiento según el parámetro

Parámetro	Mortadela	Formulación	
		Nitrito de sodio [mg/kg]	eritorbato de sodio [mg/kg]
Nitrito residual	3	50	500
Intensidad del color	1	200	500
Estabilidad del color	5	50	250

Finalmente y dado que en todas las formulaciones analizadas se cumple con la legislación en cuanto a la concentración de nitrito residual, se propone la formulación 5, en la cual se emplean 50 mg/kg de nitrito de sodio y 250 mg/kg de eritorbato de sodio, dado que con esta, se obtienen los mejores resultados para la estabilidad del color.

4. Conclusiones

- La concentración de nitrito residual es directamente afectada por el eritorbato de sodio, conforme la concentración de eritorbato de sodio aumenta la concentración de nitrito residual disminuye; siendo la relación 50 mg/kg y 500 mg/kg de nitrito y eritorbato de sodio, respectivamente, la que minimiza la concentración de nitrito residual.

- La formulación con la cual se maximiza la intensidad de la coordenada R es de 200 mg/kg de nitrito de sodio y 500 mg/kg de eritorbato de sodio; con esta relación se obtiene una concentración de nitrito residual de 64,79 mg/kg en el día 1 y de 16,09 mg/kg en el día 30, y variación de color del 42% hasta día 30.

- La formulación que permite mantener la estabilidad del color durante 30 días de almacenamiento corresponde a la formulación 50 mg/kg y 250 mg/kg de nitrito y eritorbato de sodio respectivamente; con una variación en escala R del 25% hasta el día 30.

Referencias Bibliográficas

- Ahmad, S., & Badpa, A. G. (2014). *Meat products and Byproducts for value Addition. In Food Processing: Strategies for Quality Assessment*. Springer, New York, NY. 125–53.
- Alvarado A., C. E., & Esquivel Landaverde, Á. R. (2016). *Evaluación de ingesta de nitritos y nitratos por consumo de embutidos de preferencia popular en el área metropolitana de San Salvador* (Tesis Doctoral). Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Anicama T., C. A. (2014). Efecto de la sustitución de grasa por puré de membrillo (*Cydonia Oblonga*) sobre la firmeza instrumental, color instrumental y aceptabilidad general de mortadela. (Tesis de Pregrado). Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú.
- Antón, A., & Lizaso, J. (2001). *Nitritos, nitratos y nitrosaminas*. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid, España.
- Arnau A., J., Guàrdia, M. D., Gratacós, M., Fernández, M., Hierro, E., Roncalés, P., ... 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*. Avances En La Producción de Elaborados Cárnicos, 66–79.
- Ayala A., H., García G., C., Sánchez P., R., Jirón V., Y., & Espinoza R., W. (2016). *Efecto de la adición de ácido ascórbico en la degradación de nitratos y nitritos en mortadela*. Ciencia UNEMI, 9(20), 85–92.
- Becerra N., J., Silva S., J., & Lopez G., L. (2018). *Determinación de la concentración de un inhibidor químico para retardar el pardeamiento de fresa deshidratada*. (Tesis de Pregrado). Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Benzo, M. T. (2006). *Determinación objetiva del color en la elaboración de pastas modelo de embutidos crudo-curados*. (Tesis Maestría). Universidad Nacional del Litoral. Santafe, Argentina.

- Castañeda, O. A., Galán V., C. A., Rodríguez, J. A., Contreras L., E., & Ramírez, G. J. (2010). *Diseño de un método para la determinación de nitritos en embutidos utilizando extracto de flor de jamaica*. Memorias in Extenso Del XXIII Congreso Nacional de Química Analítica, (1), 302–307.
- Cobos, Á., & Díaz, O. (2015). *Chemical Composition of Meat and Meat Products*. Handbook of Food Chemistry, 471–510.
- Decreto Numero 2162. Ministerio de Salud de la Republica de Colombia, Bogotá, Colombia, 1 Agosto de 1983.
- Duarte, R., Meléndez, L., Colmenarez, K., Malandrino, A., Matute, S., & Noguera, R. (2014). *Niveles de concentración de nitritos y nitratos en salchicha y jamones*. Revista Del Colegio de Médicos Veterinarios Del Estado Lara, 8(2). Mexico. 54–59.
- Dubé, D. P., & Robles, G. A. (2000). *Cambios de coloración de los productos cárnicos*. Rev Cubana Aliment Nutr, 14(2), Cuba. 114-23.
- FAO, IICA, & Prodar. (2003). *Fichas técnicas Procesados de Carnicos*. Igarss 2014, 3–5.
- Fernández S., I., García M., E., & Fuentes L., A. (2014). *Determinación de Nitratos y Nitritos en lechuga por HPLC*. Departamento de Tecnología de alimentos. Universitat Politècnica de València, España. 1–9.
- Flores, E. F., Zalazar, R., Ayala, P., Hernaez, L., & Figueroa, L. (2016). *Determinación de nitritos y nitratos en productos cárnicos por HPLC de par iónico*. Publicación Científico Tecnológica, 10. Senasa, Argentina. 14–22.
- Freixanet, L. (2010). *Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero*. Metalquimia SA Artículos tecnológicos. Gerona, España. 27–41. Recuperado de <http://es.metalquimia.com/upload/document/article-es-12.pdf>
- Gallego R., J. A. (2013). *Fuente alternativa de nitratos para la industria cárnica: Influencia del extracto de apio y cultivos iniciadores sobre el color del jamón cocido tipo Medellín*. (Tesis Doctoral). Universidad Miguel Hernández. Elche, España.

- García G., R. M. (2015). *Aditivos alimentarios*. Departamento de Bromatología y Tecnología de los alimentos, Universidad de Córdoba. España. 16-21.
- Gil S., D. A. (2009). *Parámetros para determinar la calidad de los productos cárnicos a través de los diferentes procesos en la empresa "Comestibles DAN."* (Tesis de Pregrado). Corporación Universitaria Lasallista. Caldas, Colombia.
- Goenaga Uceda, I. (2010). *Estabilidad del color de la carne de ternera*. (Tesis de Pregrado). Universidad Pública de Navarra. España. Recuperado de <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/2204>.
- Gonçalves, J. H., Serpa, G. U., Cunha, N., Gouveia, T., & Maciel, P. (2014). Um modelo simples e parametrizável para classificação de cores no sistema RGB. *IX Congress Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação*, 9, 9.
- Hernández Cázares, AS. (2010). *Control de calidad y seguridad de la carne y productos cárnicos curados mediante el uso de sensores enzimáticos*. (Tesis doctoral no publicada). Universitat Politècnica de València, España.
- Huanca, D., & Solis, R. (2010). *Determinación de nitritos y nitratos en hot dogs de consumo directo por estudiantes del 5º y 6º grado de educación primaria del distrito de Villa el Salvador*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 86. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1635%0Ahttp://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/1635/Huanca_sd.pdf?sequence=1.
- Jaya, R. (2004). *Utilización de diferentes niveles de corazón de bovino (0, 4, 8 y 12%) como coadyuvante en la coloración de la mortadela especial*. (Tesis Licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Rio Bamba, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/3281>.
- Keeton, J. T., Osburn, W. N., Hardin, M. D., Bryan, N. S., & Longnecker, T. (2012). A national survey of the nitrite/nitrate concentrations in cured meat products and nonmeat foods available at retail. *J. Agric. Food Chem*, 60, 3981–3990.
- Lago, J. L. V. (1997). *Tecnología De Los Embutidos Curados*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(5), 129–133. <https://doi.org/10.1080/11358129709487572>.

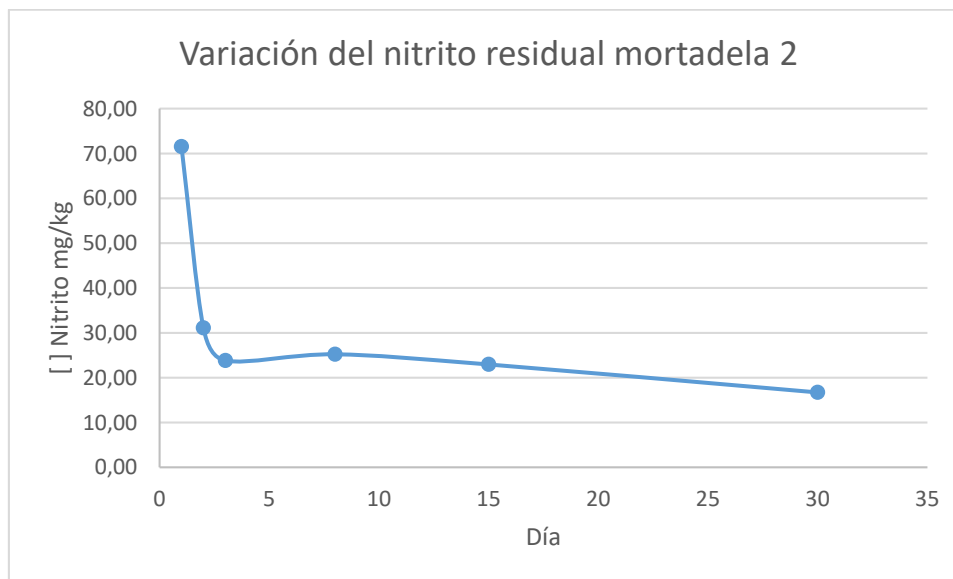
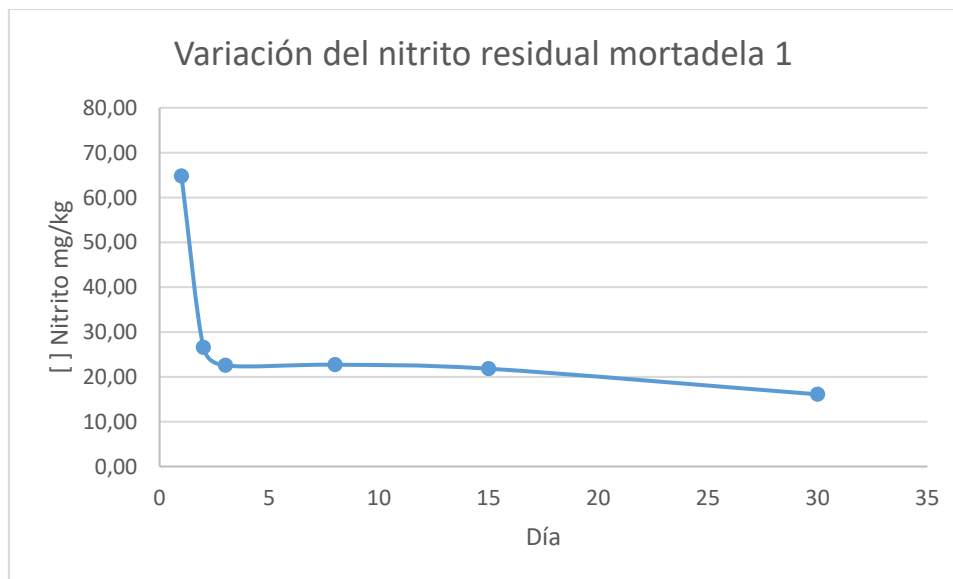
- Lopez F., K., & Ramirez Zelaya, V. L. (2014). *Cuantificación de la concentración de Nitrito de sodio en salchicha, jamón y mortadela comercializados en supermercados del municipio de Santa Ana en el año 2013*. (Tesis Licenciatura). Universidad de El Salvador. San salvador, El Salvador.
- Lugo, E. B. (2008). Nitritos y Nitratos: Su uso, control y alternativas en embutidos cárnicos. *Nacameh*, 2(2), 160–187. Recuperado de <http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/>
- Martín Juárez, B. (2005). *Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica*. (Tesis de pregrado). Universitat de Girona. Cataluña, España.
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42(2), 39–48. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>
- Moreno, R. R. (2014). *Productos Cárnicos Fermentado-Curados Funcionales Y Seguros. Nueva Vía De Ingestión De Probióticos*. (Tesis Doctoral). Universitat de Girona. Cataluña, España.
- Ortiz, A. A. (2002). *Elaboración de productos cárnicos*. Sagarpa. 15, 1–8
- Owen, T. (2000). *Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna*. Alemania: Agilent Technologies.
- Oyagüe, J. M. (2007). *Estabilidad del color de la carne fresca*. *Nacameh*, 1(1), 67–74. Recuperado de http://www.geocities.com/nacameh_carnes/index.html
- Rada-Mendoza, M., Figueroa, J. D., Solarte, A. D., & Usuriaga, Y. (2016). *Análisis del contenido de nitritos y almidón en salchichones de diferentes tipos de carne comercializados en Colombia*. *Agronomía Colombiana*. 34(1Supl), S767-S769.
- Sainz, R. D., & de la Torre, F. (1993). Carne de añojo: conformación, calidad y color Nutrición y aditivos alimentarios. *Mundo Ganadero Dossier*, (June), 46–53.

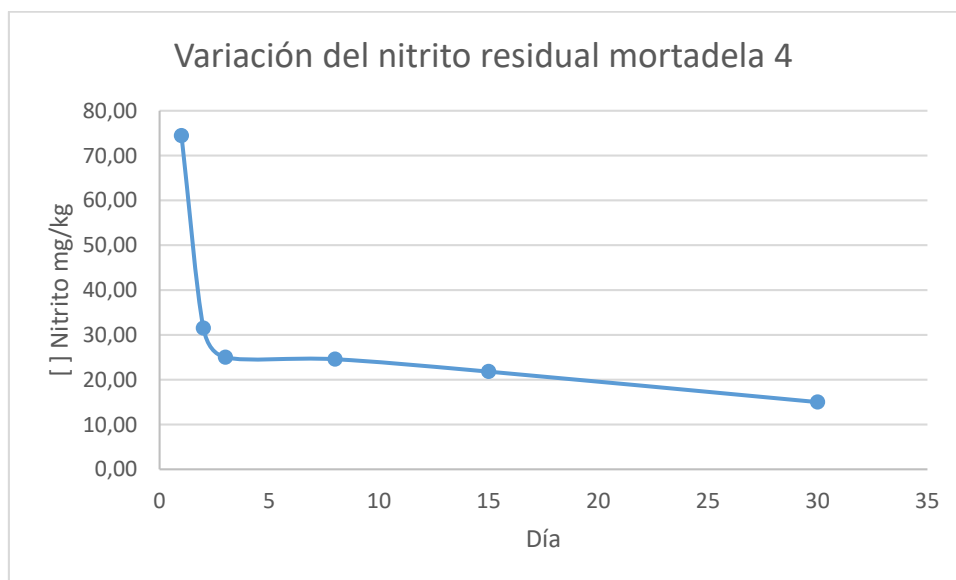
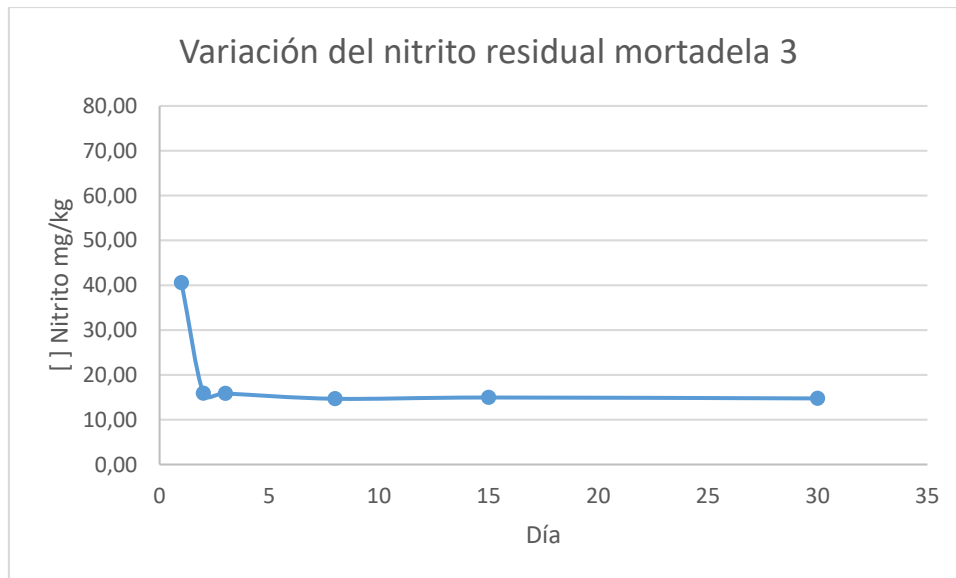
- Silverstein, T. P., Kirk, S. R., Meyer, S. C., & Holman, K. L. M. F. (2015). *Myoglobin structure and function: A multiweek biochemistry laboratory project*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 43(3), 181–188. <https://doi.org/10.1002/bmb.20845>
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2011). *Sodium nitrite in processed meat and poultry meats : a review of curing and examining the risk/benefit of its use*. American Meat Science Association, 3, 1–14.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. (2013). *Fundamentals of analytical chemistry*. Belmont Canada: Nelson Education.
- Tarté, R. (Ed.). (2009). *Ingredients in Meat Products Properties, Functionality and Applications (I)*. Wisconsin, Estados Unidos de America: Springer.
- Teijón, J. M., Pérez García, J. A., Olmo López, R. M., & García Albenda, C. (1996). *Química: Teoría y problemas*. Madrid: Editorial Tébar. <https://doi.org/AB-216-1996>
- Tenorio López, F. A., Del Valle M, L., & Pastelín H, G. (2005). Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 36(1), 31–41.
- Torres G., A. N. (2017). Generalidades de los productos cárnicos (embutidos). (Tesis de Pregrado). Saltillo, Coahuila, México.
- Totosaus, A. (2015). *Relación entre el contenido de mioglobina y oximioglobina con el color de carne fresca de res y pollo*. Tecnología de Alimentos, 45(4), 106-110.
- Vargas Velásquez, C., López Reinoso, R. A., & Flores Artunduaga, L. M. (2014). *Evaluación de la concentración de nitratos/nitritos y cloruro de sodio en embutidos expendidos en la Ciudad de Tarija*. Ventana Científica, 1(7), 1–8.
- Ventanas, S., Martín, D., Estévez, M., & Ruiz, J. (2004). *Nitratos , nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos (I)*. EUROCARNE, 129(January), 1–15.

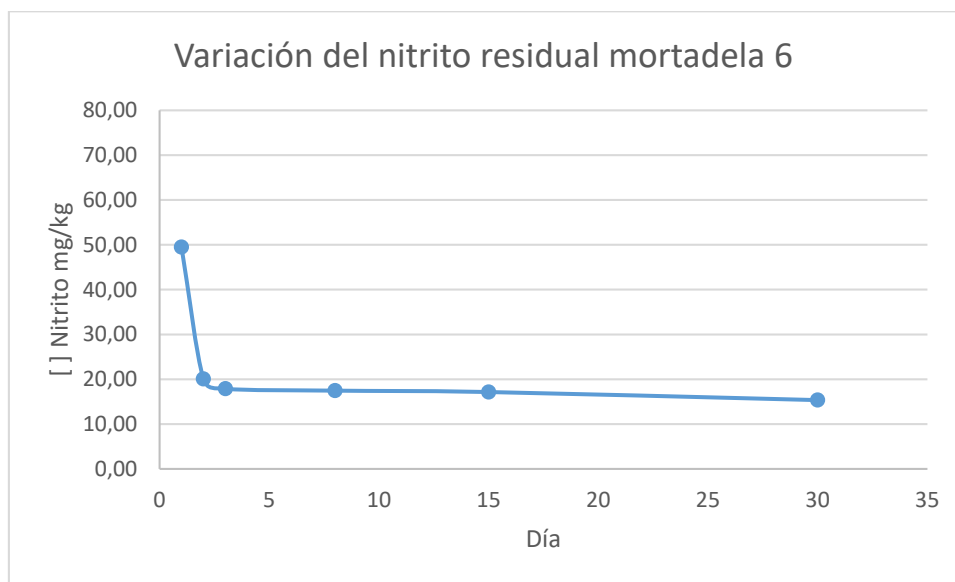
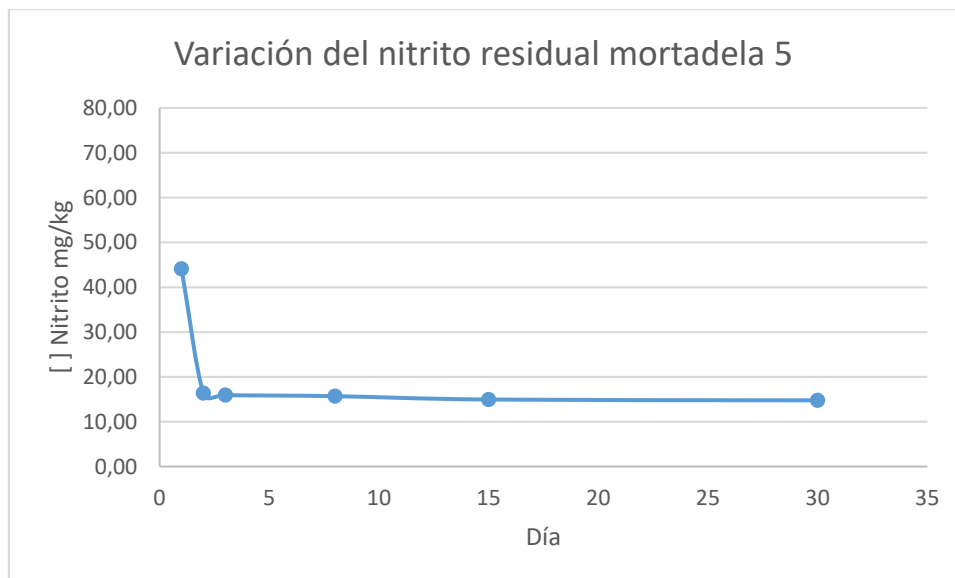
- Viriyarattanasak, C., Hamada-Sato, N., Watanabe, M., Kajiwara, K., & Suzuki, T. (2011). *Equations for spectrophotometric determination of relative concentrations of myoglobin derivatives in aqueous tuna meat extracts*. *Food Chemistry*, 127(2), 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.001>
- Wang, Q. H., Yu, L. J., Liu, Y., Lin, L., Lu, R. gang, Zhu, J. ping, ... Lu, Z. L. (2017). *Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review*. *Talanta*, 165(October 2016), 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.044>
- Wu, F., Towfic, F., Dobbs, D., Honavar, V., Valdar, W. S. J., Shikama, K., ... Giraud, M. (2002). *Biochimica et Biophysica Acta Expression patterns and adaptive functional diversity of vertebrate myoglobins*. *BBA - Proteins and Proteomics*, 118(6), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.037>
- Zhang, Y. (2013). *Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis, Regulation and Enhancement*. Hubei, China: Springer <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4127-4>
- Zurbrigen, C. J. (2009). *Comparación de los diversos factores que influyen sobre el desarrollo del color en las distintas etapas de elaboración de pastas de productos cárnicos crudo- curados*. (Tesis Maestría). Universidad Nacional del Litoral. Santafe, Argentina.

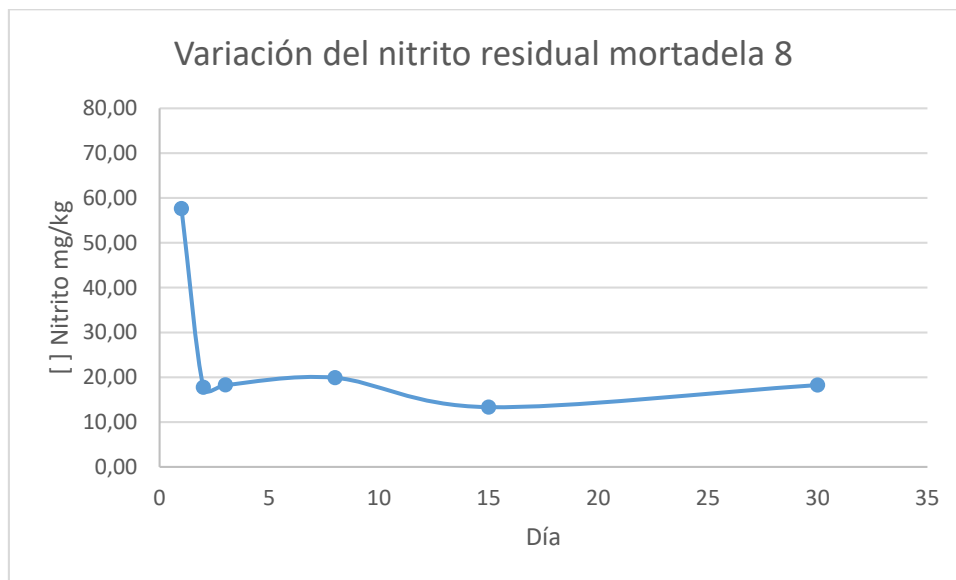
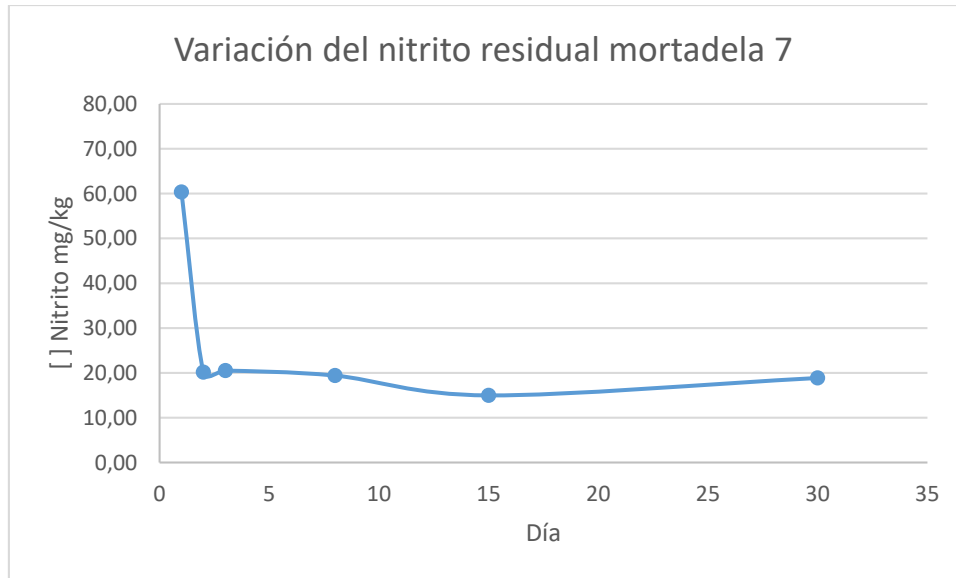
Apéndices

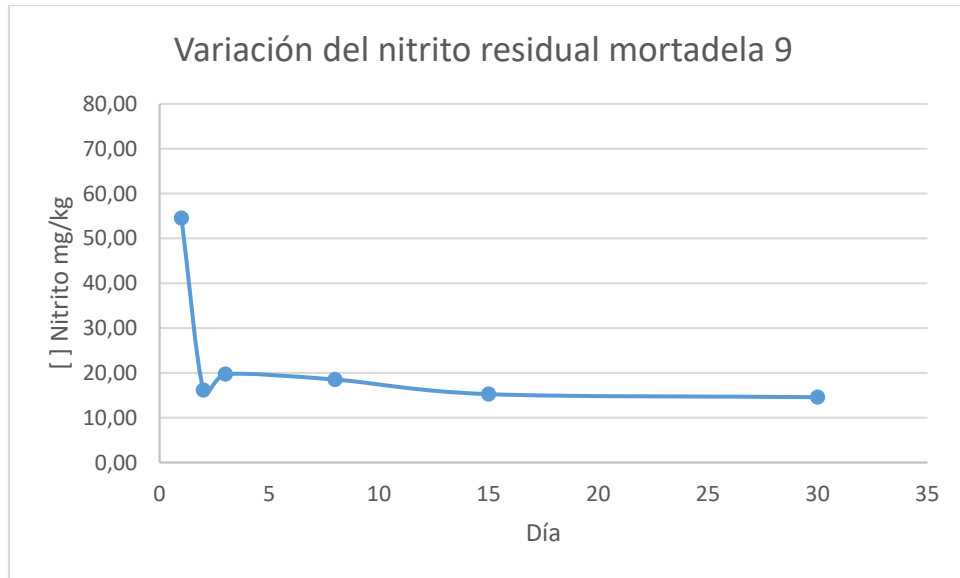
Apéndice A. Gráficas de la variación de la concentración de nitrito de sodio en 30 días.



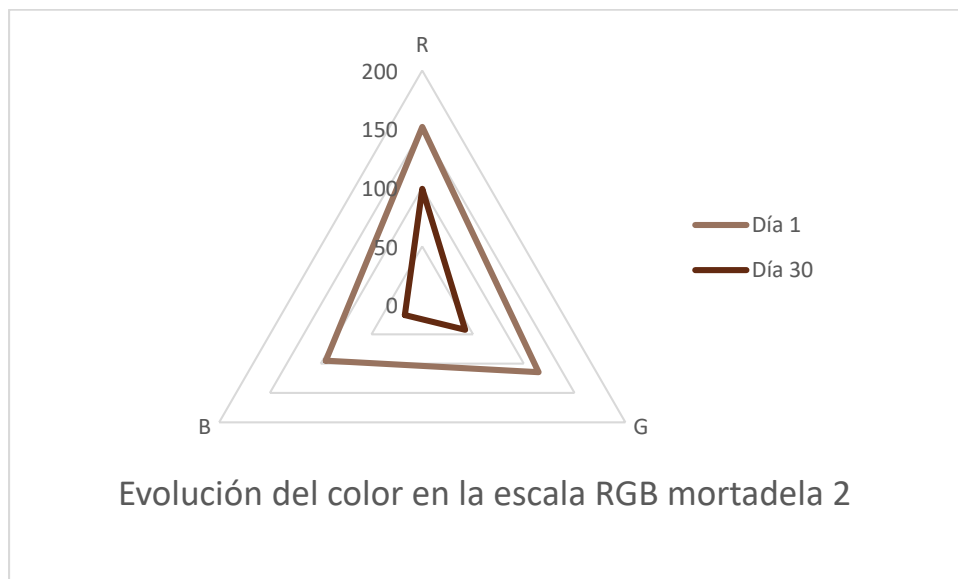
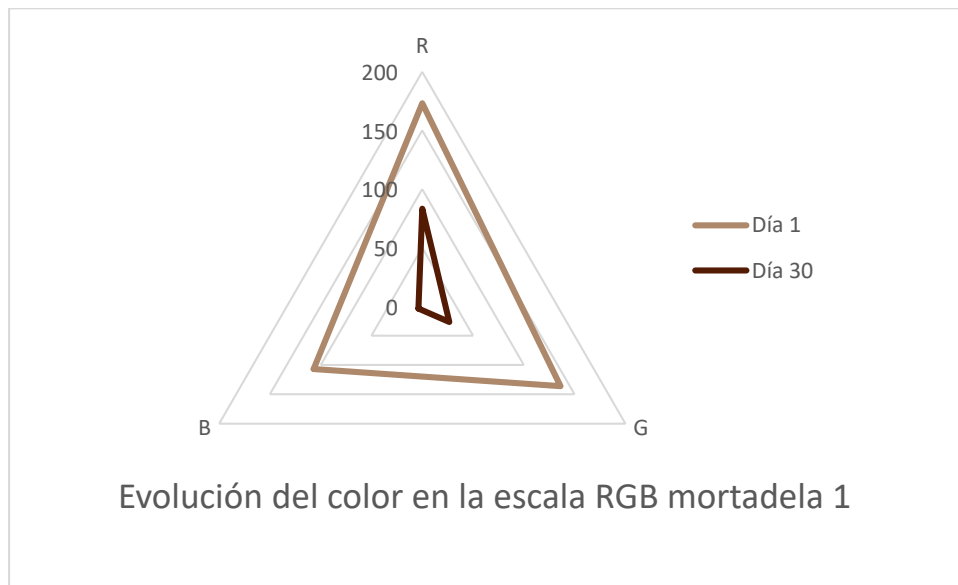


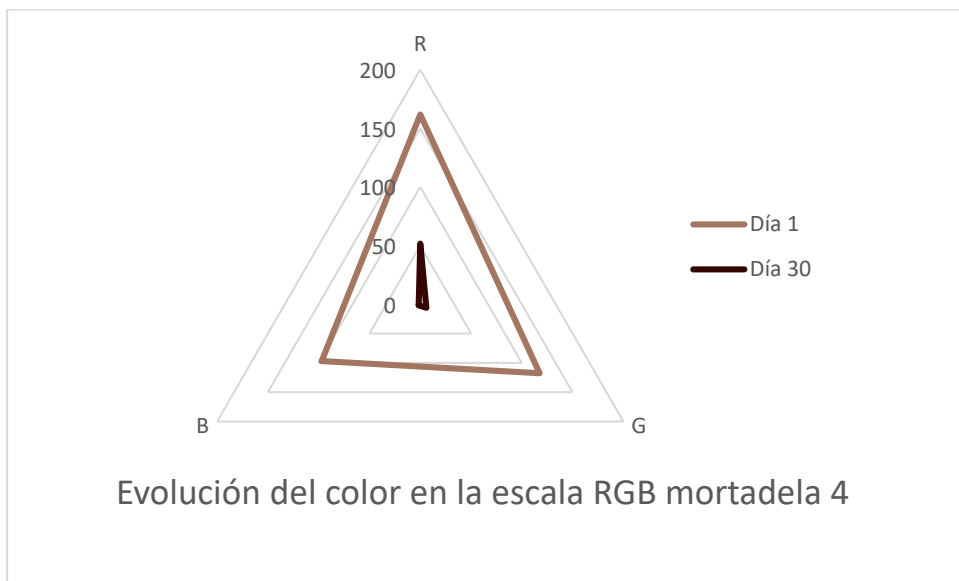
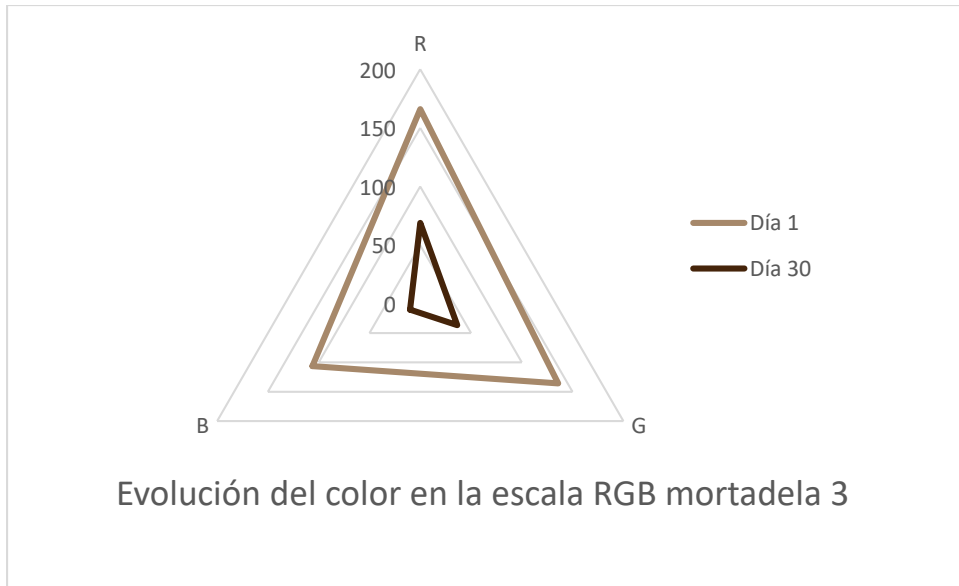


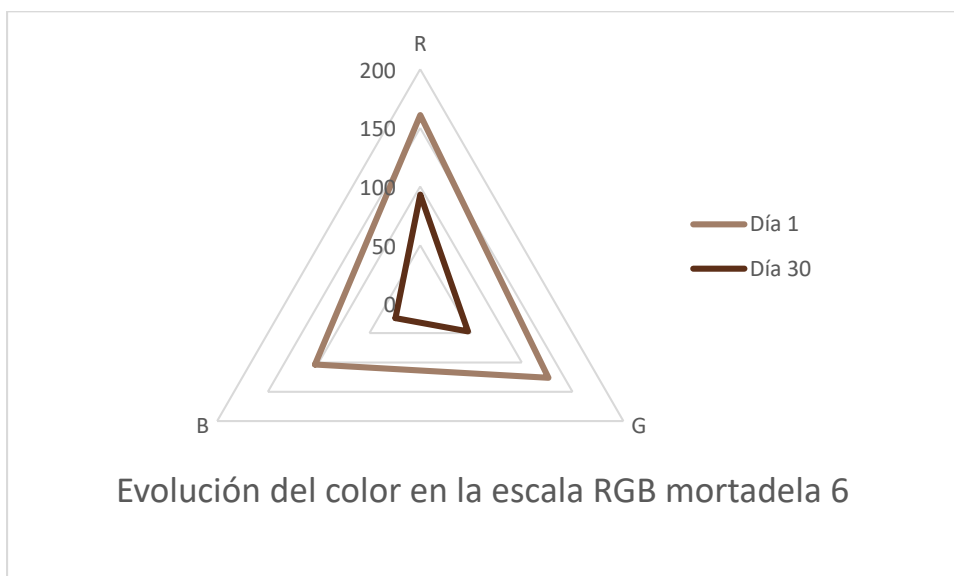
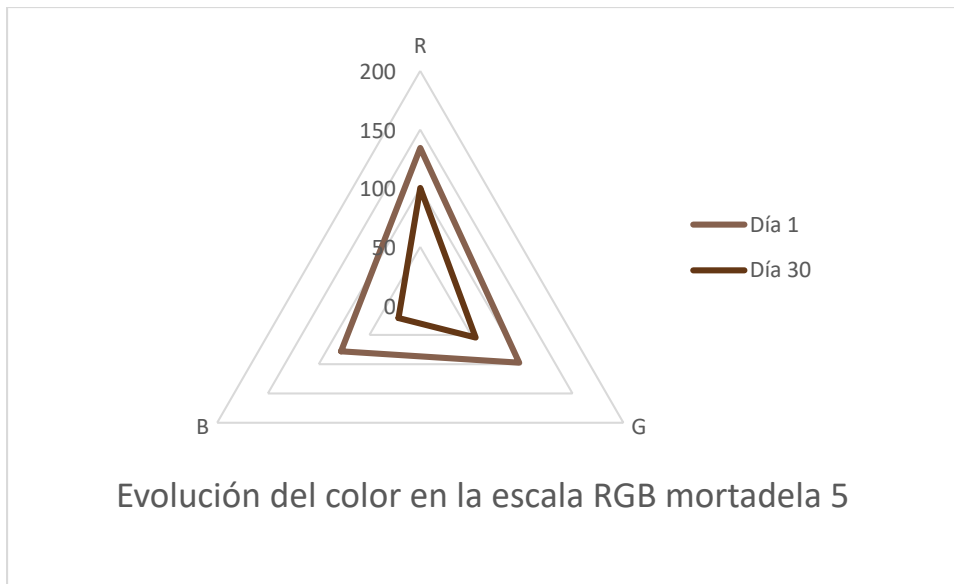


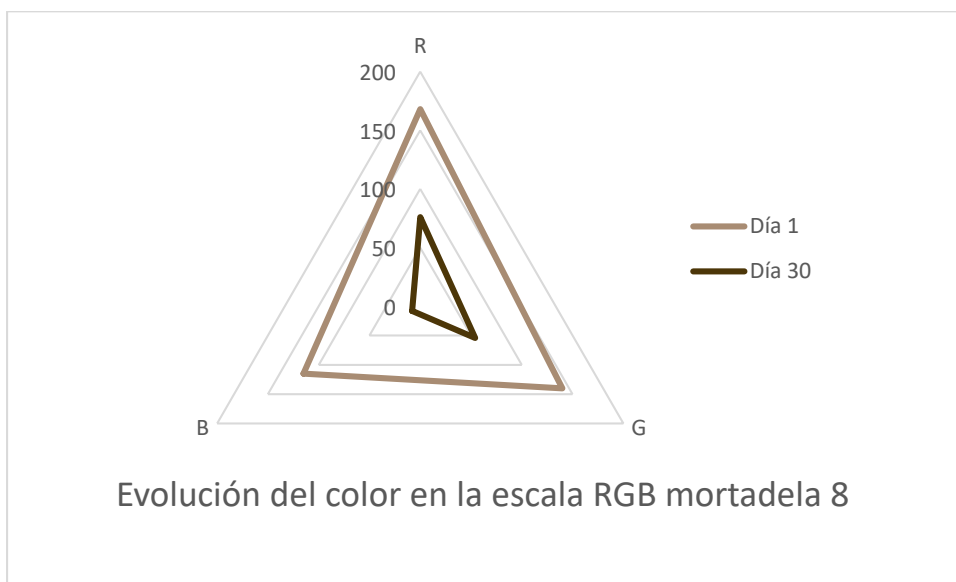
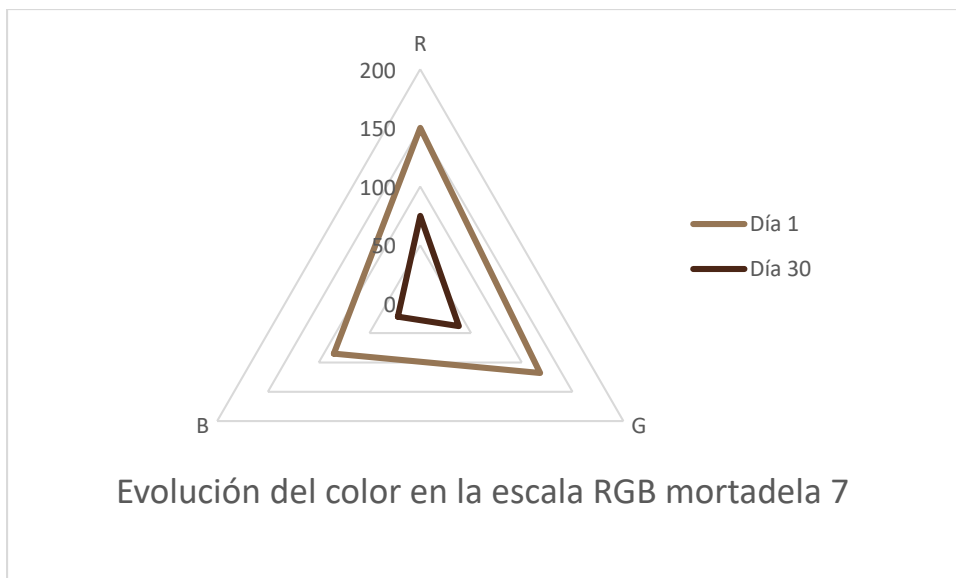


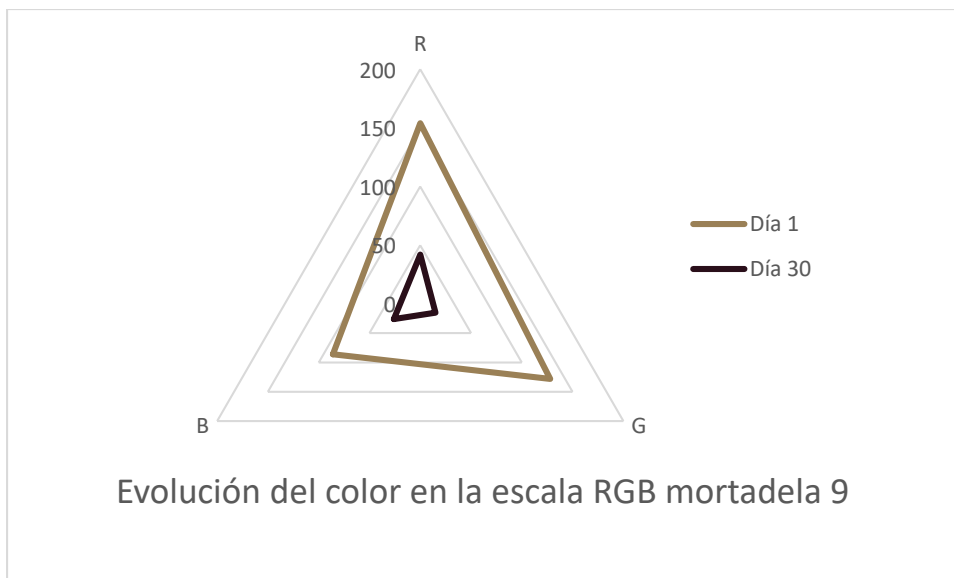
Apéndice B. Gráficas de contorno para cada mortadela en los días 1 y 30











Apéndice C. Variación en la coordenada R para todas las mortadelas.