Uso de reactivos colorimétricos en seguridad alimentaria

Monitorizar la higiene de los alimentos es clave para garantizar seguridad alimentaria y una calidad óptima del producto final. Los alimentos no son productos estériles y pueden contener microorganismos bien por la adición de microorganismos externos para llevar a cabo procesos tecnológicos, o bien debido a contaminaciones externas. Distintos microorganismos, además de los patógenos, pueden deteriorar el producto acortando su vida útil o bien ser indicadores de alteraciones que comprometerán su calidad. Es por ello que el uso de ciertos aditivos con poder conservante es fundamental para mantener la seguridad alimentaria, alargando la vida útil del producto.

Los **métodos enzimáticos** y químicos son análisis **eficientes, sensibles, altamente específicos y de sencillo uso** que permiten la **determinación de diversas sustancias** de interés alimentario permitiendo una monitorización del proceso y la rápida toma de decisiones.

La determinación indirecta de microorganismos puede efectuarse de forma rápida, asequible y eficiente mediante la detección de subproductos de su metabolismo tales como **ácido acético, ácido láctico o histamina** (Fig. 1). Por otro lado, algunos de los conservantes más utilizados en la industria alimentaria como **sulfitos y nitratos/nitritos** también pueden ser analizados de forma sencilla mediante esta tecnología.

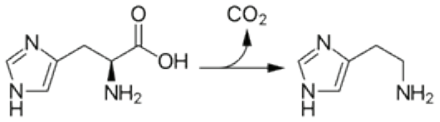

Fig. 1. Descarboxilación de histidina en histamina

Los alimentos son sistemas complejos formados por diferentes moléculas interrelacionadas entre sí tales como proteínas, hidratos de carbono, iones, grasas, etc. La diversidad bioquímica de estas moléculas hace necesario que en todos los análisis exista un buen pretratamiento de la muestra que permita la **extracción del analito problema**, evitando posibles interferencias. La optimización de estos métodos de extracción es clave para obtener resultados precisos. Por otro lado, es necesario disponer de **métodos específicos** que permitan detectar y cuantificar la concentración del analito de forma rápida y sensible. Finalmente, es necesario contar con **validaciones y ensayos de aptitud** que respalden los resultados obtenidos.

BioSystems, investiga y desarrolla reactivos y equipos teniendo en cuenta estas premisas y tomando especial interés en la validación del reactivo en diferentes matrices alimentarias. Para ello, realiza validaciones internas y con terceros para garantizar la fiabilidad de sus resultados, participando también en ensayos de aptitud interlaboratorio (BIPEA, FAPAS[1]).

Para realizar las comparativas, diferentes muestras alimentarias se analizan en paralelo mediante el método oficial o reactivo de referencia y el reactivo BioSystems. Los dos procedimientos de medida se comparan empleando una regresión lineal[2] ($y = a + bx$). La comparación entre los procedimientos de medida se evalúa por las diferencias observadas entre la regresión lineal y la línea identidad, que tiene una ordenada en el origen (a) de 0 y una pendiente (b) de 1. Los métodos pueden considerarse equivalentes cuando el intervalo de confianza de la ordenada en origen contiene el valor 0 y el intervalo de confianza de la pendiente contiene el valor 1.

En los ensayos de aptitud, una muestra problema con valor previamente asignado pero desconocido es recibida en BioSystems y analizada. El resultado se reporta a la organización FAPAS quien a continuación, acredita si el resultado obtenido ha sido satisfactorio.

A continuación se detallan los resultados obtenidos para distintos analitos de interés y en función de la matriz analizada.

Nitratos/Nitritos en carne

Los nitratos y nitritos son sustancias nitrogenadas usadas como aditivos conservantes en productos cárnicos gracias a su potente acción contra Clostridium botulinum. Aunque su uso se encuentra justificado para garantizar la seguridad de estos alimentos, la formación de nitrosaminas a partir de la combinación de estos compuestos con otras aminas presentes en los alimentos puede presentar efectos adversos en la salud humana. Es por ello que su control se encuentra estrictamente regulado.

El reactivo BioSystems se ha desarrollado optimizando la correcta extracción de los nitritos y/o nitratos de la muestra y el posterior análisis del extracto acuoso. Los nitritos presentes en la muestra reaccionan con la la sulfanilamida (SA) y la naftiletilendiamina (NE) en medio ácido generando un compuesto que se cuantifica por espectrofotometría a 560 nm (Fig.2.). En una segunda determinación, el nitrato se convierte en nitrito empleando nitrato reductasa en presencia de NADPH y FAD y se miden conjuntamente los nitritos iniciales y los nitritos obtenidos a partir de los nitratos. La diferencia de los resultados obtenidos con las dos reacciones proporciona la concentración de nitratos.

[1]Fapas Proficiency Tests for Food Chemistry

[2]Pollock, Jefferson, Kane, Lomax, MacKinnon and Winnard, 1992 and Stockl, Dewitte and Thienpont, 1998

Fig. 2. Determinación de nitritos: reacción colorimétrica

Con el objetivo de evaluar la medición se realiza una comparativa interna del método frente a un reactivo de referencia[3]. Se analizan nitritos y nitratos en 30 muestras cárnicas en paralelo. Los resultados de las comparativas (Fig.3. y Fig.4.), que presentan buena correlación, pueden verse a continuación:

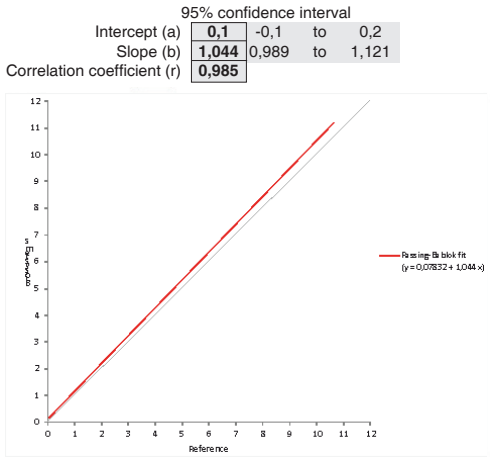

Fig. 3. Comparativa de nitritos BioSystems-Reactivo de referencia (mg/Kg)

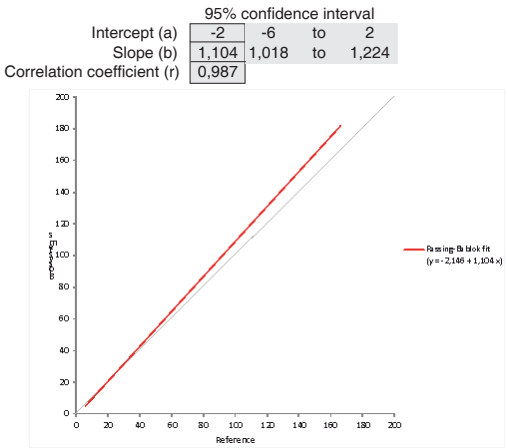

Fig. 4. Comparativa de nitratos BioSystems-Reactivo de referencia (mg/Kg)

Sulfitos en crustáceos

Los sulfitos, en sus diferentes formas, son usados en tecnología alimentaria como conservantes para mejorar las características del producto y garantizar su seguridad y vida útil. A pesar de su uso y de su eficacia como conservantes, su ingesta en individuos sensibles puede provocar efectos adversos. Es por ello que su concentración y etiquetado están regulados.

Multitud de alimentos tales como vino, galletas, mermeladas, productos cárnicos o crustáceos contienen sulfitos. Dentro de las distintas aplicaciones uno de los productos alimentarios que revierte mayor interés económico son los crustáceos (mariscos).

Para su determinación, las muestras de crustáceos son tratadas con un tampón que consigue la extracción completa de los sulfitos presentes en la muestra y su estabilización hasta su medición. El método espectrofotométrico para la determinación de sulfitos se basa en el uso pararosanilina (PR) en presencia de formaldehído (F). El SO_2 se une al formaldehído y posteriormente a la pararosalina para generar un compuesto que se puede medir a 560 nm (Fig. 5.). Esta reacción es rápida y fácilmente automatizable. El análisis de sulfitos es una medida que suele presentar interferencias inespecíficas (I). Para ello, la solución propuesta por BioSystems es la de determinar los sulfitos y las interferencias y en paralelo determinar exclusivamente las interferencias por eliminación de los sulfitos presentes con un agente oxidante. La sustracción de las interferencias de la primera medida nos da como resultado los sulfitos presentes en la muestra.

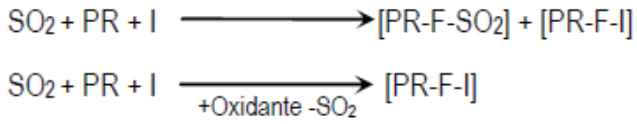

Fig. 5. Determinación de sulfitos: reacción colorimétrica y eliminación de interferencias

Para la determinación de sulfitos en marisco, se realiza, además de las validaciones internas, un estudio comparativo con Anfaco-Cecopesca[4]. La validación compara los valores obtenidos con reactivo BioSystems frente al método oficial de determinación de sulfitos, Monier-Williams. Los resultados (Fig. 6.), que presentan buena correlación, se muestran a continuación:

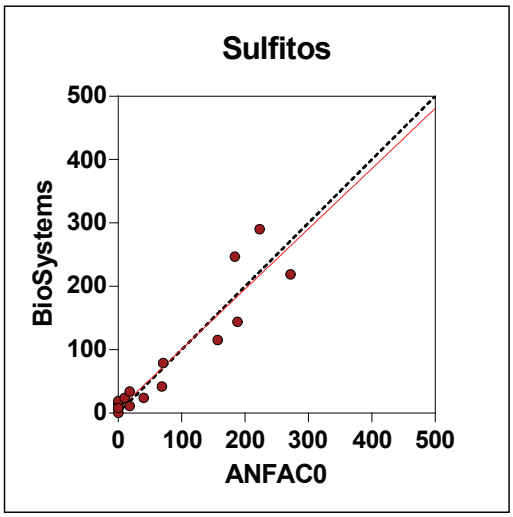

Fig. 6. Comparativa de análisis de sulfitos en marisco (mg/Kg)

[3]Reactivo de Sigma-Aldrich
[4]Asociación Nacional de Fabricantes de Conservas de Pescados

Histamina en pescado

La histamina es una amina biógena procedente de la descarboxilación bacteriana del aminoácido histidina. Se encuentra presente en determinados alimentos como pescados, vino, quesos o carnes procesadas siendo un indicador de calidad del producto. En individuos sensibles, la ingesta de histamina procedente de alimentos puede desencadenar efectos indeseados por lo que su control es fundamental. Además, la histamina es un marcador de higiene y calidad del producto, por lo que su control está regulado en distintas normativas y estándares de calidad.

Una vez realizada la extracción acuosa en matriz pescado, el reactivo BioSystems se basa en la reacción de la enzima histamina deshidrogenasa que reduce específicamente la histamina presente en la muestra. En una cadena de reducción/oxidación, el fenilmetasulfato (PMS) transporta un electrón hasta una sal soluble de tetrazolio que al reducirse forma formazán, que se cuantifica por fotometría a 420 nm (Fig. 7.).

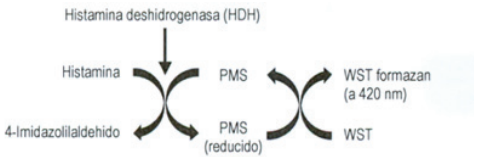

Fig. 7. Determinación de histamina. Cadena de reacciones.

Para la determinación de histamina en pescado, se realizan distintas validaciones y dos estudios de aptitud FAPAS cuyos resultados, altamente satisfactorios, pueden observarse a continuación:

	Ref.	Lot.	Material	BioSystems	FAPAS value	Unit
Reference material	T27176QC	#2	Canned Fish (Tunna in oil)	198	216 (range: 186-247)	mg/Kg
QC Material	TET040RM	#112	Pilchards in tomato sauce	16,4	16,6	mg/Kg

Conclusiones

El uso de reactivos colorimétricos, ya sean enzimáticos, químicos o combinación de ambos, es una potente herramienta de análisis en seguridad alimentaria por su eficiencia, rapidez y coste. Los reactivos, además de presentar alta especificidad y sensibilidad, son desarrollados con métodos de extracción específicos para cada matriz alimentaria y con el respaldo de estrictas validaciones y permiten su automatización.

El rango de reactivos disponibles permite además la determinación de otras sustancias de relevante interés en industria alimentaria tales como azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, etc.), ácidos orgánicos (cítrico, láctico, ascórbico, etc.) o cationes, en diferentes muestras alimentarias (zumos, cervezas, helados, productos de pastelería, etc.).

El sistema FOOD QUALITY de reactivos e instrumentos es en definitiva, una alternativa óptima al uso de las lentas metodologías manuales o a los complejos y costosos análisis realizados con métodos como la cromatografía líquida de alta resolución, en los que además es necesario disponer de personal técnico altamente cualificado.