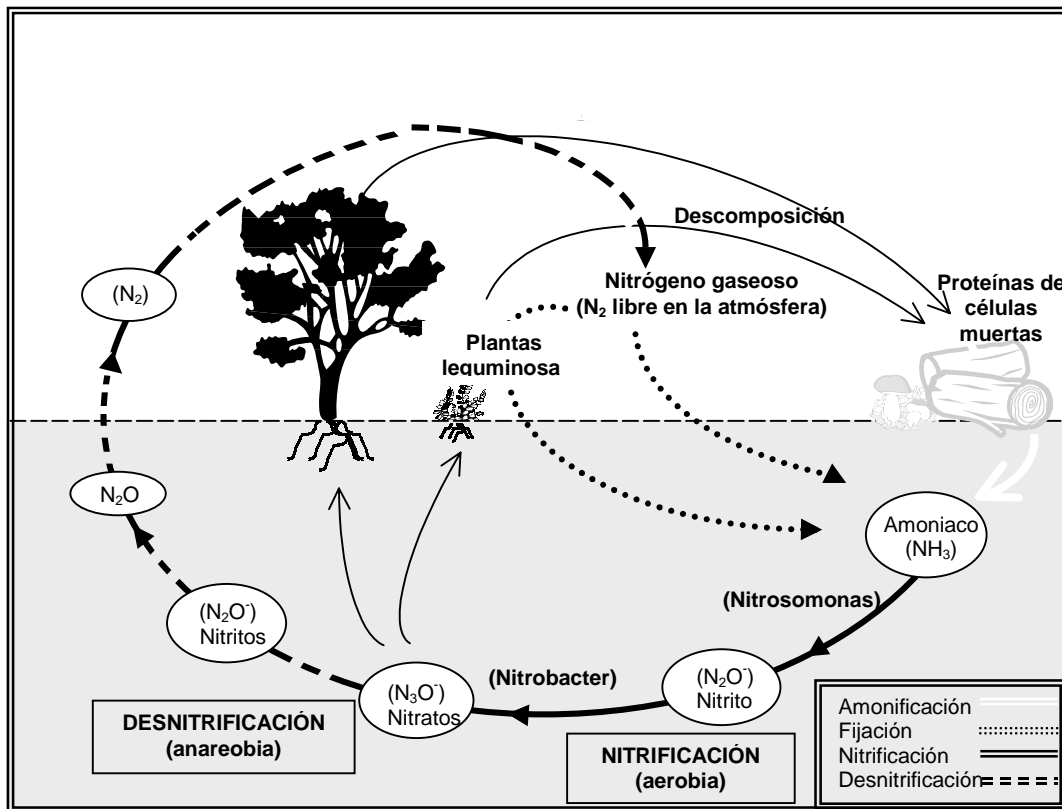


NITRITOS, NITRATOS Y NITROSAMINAS
 Almudena Antón y Jesús Lizaso

INTRODUCCIÓN

Nitratos y nitritos son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza, formando parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato (NO_3^-) es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido por acción microbiológica. El nitrito (NO_2^-), es oxidado con facilidad por procesos químicos o biológicos a nitrato, o bien reducido originando diversos compuestos.



En los suelos, los fertilizantes y vertidos residuales conteniendo nitrógeno orgánico son descompuestos para dar en un primer paso amonio (NH_4^+), que a continuación es oxidado a nitrito y a nitrato. Parte de este nitrato es absorbido por las plantas, que lo emplean en la síntesis de proteínas vegetales, pudiendo el resto pasar a las aguas subterráneas.

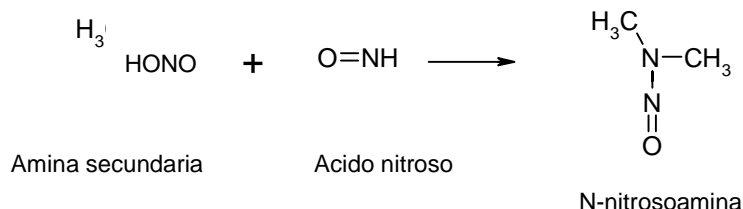
En la atmósfera, la formación de compuestos nitrogenados tiene lugar como consecuencia de la combinación de nitrógeno y oxígeno molecular a altas temperaturas producidas por fenómenos naturales como las descargas eléctricas durante las tormentas o la actividad volcánica, o bien producidas por combustiones de vehículos y procesos industriales. Los óxidos de nitrógeno así formados se oxidan dando lugar a nitratos. Los niveles de concentración de nitrato en la atmósfera varían enormemente de unas zonas a otras del planeta, encontrándose en las zonas de menor concentración un rango de 0.1-0.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y en las zonas de mayor concentración valores de 1-40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En zonas industriales se han encontrado valores de hasta 5 mg/litro en agua de lluvia.

La concentración de nitratos en aguas superficiales normalmente es baja (0-18 mg/Litro), pero puede llegar a alcanzar elevados niveles como consecuencia de las prácticas agrícolas o residuos urbanos y ganaderos (especialmente granjas), o por la aportación de aguas subterráneas ricas en nitratos (éstas con concentraciones cada vez más elevadas).

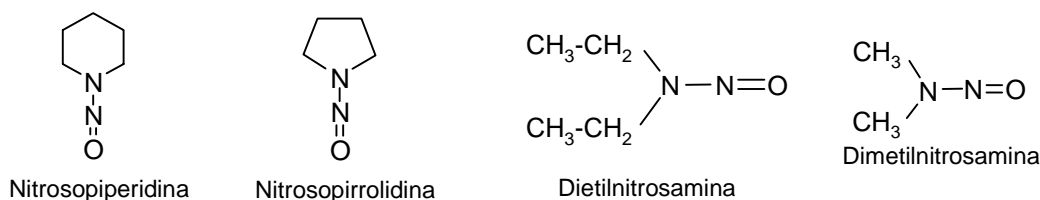
El nitrato se emplea principalmente en la industria de los fertilizantes, así como agente oxidante en explosivos y como sal potásica purificada en la fabricación de *crystal*. El nitrito fundamentalmente se emplea como aditivo alimentario (E-249 nitrito potásico, E-250 nitrito sódico), especialmente en carnes curadas. El nitrato es añadido en ocasiones junto con el nitrito como conservante (E-251 nitrato sódico, E-252 nitrato potásico), ya que sirve como reserva de éste al ir transformándose lentamente en nitrito.

La principal preocupación derivada de la presencia de nitratos en alimentos o en agua potable tiene dos motivos: por un lado, los efectos tóxicos producidos por un exceso de nitratos en la dieta; por otra parte, pueden causar la formación endógena de N-nitrosocompuestos, de efectos cancerígenos (como las nitrosaminas).

Los N-nitrosocompuestos son agentes teratógenos, mutágenos y probables carcinógenos, altamente peligrosos para la salud humana. Se originan como consecuencia de la reacción de las aminas secundarias (aromáticas y alifáticas) con el ácido nitroso HONO.



Si bien se forman gran variedad de estos compuestos, los más significativos desde el punto de vista de la toxicología alimentaria son las dialquilnitrosaminas (Dimetilnitrosamina, Dietilnitrosamina), las nitrosaminas de estructura cíclica (N-nitrosopiperidina, N-nitrosopirrolidina) y acilalquil-nitrosaminas o nitrosamidas (nitrosoguanidina).





NITRATOS EN LOS ALIMENTOS: SU FUNCIÓN COMO ADITIVOS

La carne puede protegerse de la putrefacción bacteriana mediante la adición de soluciones concentradas de sal común. Pero la carne que está conservada únicamente con cloruro sódico toma un color pardo-verdoso atribuible a la conversión de la hemoglobina en metahemoglobina. Para que se mantenga el color rojo se añade al cloruro sódico para salazones una pequeña cantidad de nitrito o nitrato, parte del cual se transforma lentamente en nitrito. El nitrito forma nitrosohemoglobina o nitrosohemocromógeno, de color rojo oscuro. Las concentraciones de nitrito sódico en salazones varían del 0.04 al 10%, dependiendo del tratamiento que se dé y del tipo de carne.

Los nitratos se emplean como aditivos en la fabricación de productos cárnicos curados y, en menor medida, en la conservación del pescado y en la producción de queso. Además de proporcionar color adecuado a la carne, los nitritos tienen otros efectos sobre los alimentos: retrasa el proceso de oxidación de los lípidos, con la consecuente disminución del característico olor de enranciamiento, produce una mayor firmeza en la textura, y provee a los alimentos de un importante efecto antimicrobiano (especialmente frente a *Clostridium botulinum* y sus toxinas).

Además de como aditivos, los nitratos como sustancias de origen natural pueden encontrarse en productos cárnicos frescos, leche y productos lácteos, cereales, frutas, bebidas alcohólicas y verduras. En la mayoría de estos alimentos se encuentran en bajas concentraciones, generalmente inferiores a 10 mg/kg y rara vez exceden los 100 mg/kg. Sin embargo, las verduras, principal aporte de estos compuestos en la dieta junto con los embutidos, presentan unos contenidos que oscilan entre 200 y 2.500 mg/kg, variando en función del procesado del alimento, uso de fertilizantes y condiciones de crecimiento.

INGESTA DIARIA ACEPTABLE

Resulta difícil estimar un promedio de ingesta de nitratos porque ésta depende de la dieta individual y del contenido de nitratos del agua potable, que también varía según las regiones e incluso según las estaciones. La ingesta total de nitratos de los alimentos oscila normalmente entre 50 y 150 mg/persona/día. Las dietas vegetarianas presentan un valor más elevado, del orden de 200 mg/persona/día, variando en función del tipo de verduras que consuman. En general, la principal fuente de ingestión de nitratos son los vegetales, siempre que el agua de bebida se mantenga en niveles de concentración de nitratos inferiores a 10 mg/l. Habitualmente, la contribución de los nitratos contenidos en el agua de bebida supone aproximadamente un 14% de la ingesta total de nitratos.

En ausencia de contaminación artificial, las aguas superficiales no contienen más de 10 mg/l de nitratos, y rara vez superan 1 mg/l de nitritos. Los valores más altos se encuentran en las aguas subterráneas, afectando a extensas áreas de la geografía española. Con excepción de la cuenca Norte, en el resto de las regiones se han detectado acuíferos contaminados con concentraciones superiores a los 50 mg/l.

La Ingesta Diaria Aceptable (IDA)⁽¹⁾ de nitratos recomendada por el comité conjunto de la FAO/OMS es de 0-3.7 mg/kg peso corporal. Puesto que la toxicidad de los nitratos proviene de su conversión en nitritos y su posible formación endógena en N-nitrosocompuestos, deberá tenerse en cuenta también la IDA de nitritos, fijada en 0-0.06 mg/kg de peso corporal. El empleo de nitrito como aditivo en alimentos infantiles para niños menores de tres meses no está permitido.

FORMACIÓN DE N-NITROSOCOMPUESTOS

Los N-nitrosocompuestos pueden tener dos orígenes diferentes: formación endógena, que es una formación natural de N-nitrosocompuestos en el estómago, y los N-nitrosocompuestos exógenos, presentes en los alimentos y en los fármacos, debidos a las técnicas de fabricación o de tratamiento.



La **formación endógena de N-nitrosocompuestos** comienza cuando los nitratos son reducidos a nitritos por los microorganismos de la cavidad bucal y estos nitritos se transforman después en óxido nítrico en el estómago debido a las condiciones allí existentes. Bajo circunstancias específicas, como la gastritis crónica, los nitritos pueden oxidarse en el estómago a agentes nitrosantes (N_2O_3 , N_2O_4) y reaccionar para formar N-nitrosocompuestos. Esta reacción se produce con precursores nitrosables, que incluyen una gran variedad de componentes de la dieta tales como: aminas secundarias (pescados, huevos, quesos, carnes...), precursores naturales en los alimentos (como ciertos aminoácidos), los alcaloides presentes en especias que se emplean para curar carnes (pimienta negra), y otros precursores que aparecen en los alimentos como contaminantes (plaguicidas, aditivos o medicamentos).

Algunos estudios parecen demostrar que la nitrosación endógena produce cantidades de N-nitrosocompuestos suficientemente grandes como para representar un riesgo relevante en condiciones habituales de ingesta de nitratos. Sin embargo, hay que considerar que estos estudios científicos se aplican a ensayos in vitro en los que se emplean productos químicos para simular las condiciones reales, en lugar de utilizar alimentos (verduras especialmente).

Por otra parte, otros estudios, tales como los de epidemiología en poblaciones que tienen una dieta rica en verduras, han revelado la existencia de una correlación negativa entre la ingesta de nitratos y el cáncer gástrico. Esto se debe, casi con toda certeza, a la protección frente a la nitrosación gástrica que ofrecen los inhibidores naturales de la dieta, tales como la vitamina C, que es un componente importante de las frutas y verduras.

Otros estudios han encontrado que, lejos de ser peligrosos para la salud, los nitratos en la dieta constituyen en realidad una parte esencial de nuestro mecanismo de neutralización de las bacterias tóxicas en el estómago. Así, se ha descubierto que la combinación de óxido nítrico y ácido del estómago es altamente efectiva para destruir bacterias perjudiciales como la Salmonella y Shigella. Los nitratos encontrados en la saliva, que proceden principalmente de la dieta podrían, por lo tanto, formar parte de las defensas del cuerpo frente a enfermedades infecciosas.

Los N-nitrosocompuestos **exógenos** aparecen en los estudios de investigación clínica como causantes de tumores. Las fuentes principales de éstos N-nitrosocompuestos exógenos (p.e. las nitrosaminas), son el humo del tabaco, **los cosméticos** y los productos alimenticios. El Comité conjunto de Expertos en Aditivos alimentarios FAO/OMS señaló algunos estudios que mostraban que las técnicas de preparación de alimentos para productos cárnicos y productos de pescado, así como verduras deterioradas o mal almacenadas, pueden promover, en determinadas condiciones, la formación de N-nitrosocompuestos. Debido a ello, el pescado no debe conservarse con nitrito sódico, ya que en su carne se forma con facilidad por ligera descomposición bacteriana, dietilamina y trietilamina, que, aunque en menor proporción, también aparecen en la carne y en los quesos. La reacción de estas aminas con los nitritos origina N-nitrosodietilamina y N-nitrosotrietilamina. Ya a temperaturas inferiores a $0^{\circ}C$ la dietilamina reacciona con los nitritos, originando N-nitrosodietilamina. El nitrato sódico, que se encuentra en pequeñas cantidades en el agua de mar, puede formar con estas aminas dimetilnitrosamina en la carne de los peces. Por este motivo la carne de los peces marinos contiene cantidades de dimetilnitrosamina muy superiores a la de los peces de agua dulce.

En los embutidos, existen compuestos que contienen piperidina y pirrolidina. La reacción de estas aminas con el nitrato contenido en la sal de curado se produce después de un largo contacto entre ambos, no en mezclas de preparación reciente. Cuando estos embutidos se almacenan durante mucho tiempo o se cocinan, es posible que se produzcan reacciones de formación de estos cancerígenos. También en la carne adobada se pueden formar nitrosopiperidina y nitrosopirrolidina por reacción de los aminoácidos prolina y lisina con el nitrito cuando se calienta fuertemente.

El proceso de malteado de la cerveza es otra vía de formación de estos compuestos. Esto se debe al desecado de la malta con óxido nítrico, que al ponerse en contacto con la dimetilamina que la cerveza contiene puede formar dimetilnitrosamina. Cambiando el sistema de desecación de la malta se elimina la aparición de este cancerígeno. También en la leche desecada aparecen dimetilnitrosaminas a causa, al



parecer, del procedimiento de desecación. El tratamiento de alimentos con corrientes de humo puede igualmente dar lugar a la aparición de compuestos nitrosos.

TOXICIDAD DE NITRITOS, NITRATOS Y NITROSAMINAS

Los riesgos más importantes derivados de nitratos y nitritos son dos:

1. **Aumento de metahemoglobinemia.** La toxicidad del nitrato en humanos se debe principalmente a que una vez reabsorbido ejerce en el organismo la misma acción que sobre la carne conservada, es decir, transforma la hemoglobina en metahemoglobina, pudiendo producir cianosis. Se han producido repetidamente intoxicaciones debido a una cantidad excesiva de nitrito sódico en las carnes en conserva, principalmente debido a una mala homogeneización entre ingredientes y aditivos. Cantidades de 0.5-1 g de nitrito producen en el hombre intoxicaciones ligeras, de 1-2 g intoxicación grave y 4 g intoxicación mortal. Por ello, la sal para salazones no debe nunca contener más de 0.5-0.6% de nitrito sódico, y la cantidad de sal empleada no debe sobrepasar los 15 mg por cada 100 g de carne tratada.

Existe una especial susceptibilidad a los nitratos/nitritos en la población infantil debido principalmente a cuatro razones:

- Acidez gástrica disminuida, lo que favorece la proliferación de microorganismos reductores de nitratos a nitritos antes de su total absorción.
- La ingesta de agua en niños, según su peso, es 10 veces superior a la de los adultos por unidad de peso corporal.
- Hemoglobina fetal (60-80% en recién nacidos), que se oxida más fácilmente a metahemoglobina.
- Desarrollo incompleto del sistema NADH-metahemoglobina reductasa en recién nacidos y pequeños, que salvo casos raros de deficiencia enzimática hereditaria, parece desaparecer al cabo de los 3-4 meses de vida.

También existen otros grupos de población de riesgo como embarazadas, ya que el nitrito atraviesa la placenta, causando metahemoglobinemia fetal, o personas con acidez gástrica disminuida o con déficit de glucosa-6P-deshidrogenasa.

2. **Formación de nitrosaminas en adultos.** La mayoría de los compuestos N-nitroso de interés en toxicología alimentaria son probables o posibles carcinógenos en humanos. En animales de experimentación son potentes carcinógenos, en todas las especies ensayadas, y tiene amplia organotropía, según donde se biotransforma para dar radicales libres alquilantes (alquildiazonio y alquilcarbonio). En los estudios epidemiológicos se ha sugerido su intervención en el desarrollo del cáncer nasofaríngeo, esofágico y gástrico.

Las nitrosaminas generadas ejercen sus efectos carcinógenos mediante este poder alquilante: la unión de los grupos alquilo (incluso los metilo, de pequeño tamaño) es suficiente para interferir en el apareamiento de las bases en la doble hélice de ADN. Este daño conlleva mutaciones y, con éstas, una probabilidad mayor de carcinogénesis.

Por todo ello, las exposiciones a compuestos N-nitroso y sus precursores deben mantenerse en el nivel más reducido posible, siguiendo las recomendaciones de la OMS.



MÉTODOS DE ANÁLISIS

La determinación de nitratos y nitrito se lleva a cabo mediante técnicas espectrofotométricas con un rango de detección de 0.01-1 mg/l para los nitratos y, dentro de los límites 0.005-0.01 mg/l para los nitritos. En aguas potables, esta es la técnica recomendada en los métodos analíticos de referencia.

Para el análisis de nitrosaminas el procedimiento más utilizado en alimentos y que se considera más adecuado es la cromatografía de gases con detección térmica (TEA), especialmente para el análisis de las nitrosaminas volátiles. El detector TEA permite una sensibilidad de hasta 50 pg (50×10^{-12} g), teniendo además la ventaja de una elevada selectividad, lo que permite reducir considerablemente los procesos de purificación. Para eliminar las posibles formaciones de nitrosaminas en los procesos de tratamiento de muestra, lo que conllevaría a una sobreestimación de las mismas, se recomienda evitar las extracciones con destilación a vacío, y emplear extracción en fase sólida o con fluidos en estado supercrítico.

NORMATIVA SOBRE NITRATOS Y NITRITOS

En el ámbito de la Unión europea, el contenido de nitritos en alimentos se halla regulado por dos leyes:

- La **Directiva 95/2/EC** del Parlamento Europeo y del Consejo, referente a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. Los niveles que establece en ciertos alimentos han sido modificados por las directivas 98/85/CE y 98/72/CE. Esta directiva establece una cantidad añadida indicativa de 150 mg/kg de nitrito (expresada como NaNO_2), y una cantidad residual ⁽²⁾ de 50 mg/kg (productos cárnicos no tratados por calor, curados o desecados), 100 mg/kg (otros productos cárnicos curados, productos cárnicos enlatados, foie gras) y 175 mg/kg (panceta curada).

En el caso de los nitratos, se indica una cantidad añadida indicativa de 300 mg/kg para el nitrato sódico, y una cantidad residual de 250 mg/kg ⁽³⁾ para productos cárnicos curados o enlatados, y 50 mg/kg ⁽³⁾ para el foie gras. La cantidad de nitrato potásico que se establece es la cantidad residual: 50 mg/kg ⁽³⁾ en queso y sucedáneos de queso a base de leche, 200mg/kg ⁽⁴⁾ en ciertos pescados escabechados y 50 mg/kg ⁽⁴⁾ en foie gras.

El **Reglamento 194/97** de la Comisión establece los niveles máximos para determinados contaminantes en alimentos. Establece unos niveles máximos de nitratos en espinacas y lechugas dependiendo de la estación en que se cosechen. Este Reglamento será derogado el 5 de abril de 2002, por aplicación del Reglamento 446/2001 de 8 de marzo de 2001. Sobre la base de los resultados de los controles llevados a cabo por los Estados Miembros en respuesta a la aplicación y mejora de sus buenas prácticas agrícolas, estos niveles serán revisados por la Comisión cada cinco años, con el objeto de reducir los contenidos máximos de nitratos.

La cuestión del contenido de nitratos en alimentos se relaciona también con la Directiva sobre Nitratos, la Directiva del Consejo 91/676/EEC de 12 de Diciembre, transpuesta al derecho español como Real Decreto 261/96. La implementación de esta Directiva implica la definición y la aplicación de un código de buenas prácticas agrícolas en cada estado miembro. Cabe esperar que este código reduzca la aplicación de nitratos en el cultivo de suelos, así como que contribuya significativamente a la protección de los recursos de agua potable frente a la contaminación con nitratos.

Las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable están reguladas por la Directiva del Consejo 75/440/CEE de 16 de junio de 1975, incorporada a la normativa española por el Real Decreto 927/88 (modificado por el Real Decreto 1541/1994), en el que se establecen los valores límite del contenido máximo de nitratos en 50 mg/l para las tres categorías de calidad de las aguas (categorías en función del tratamiento que han de recibir para su potabilización).



La calidad de las aguas destinadas a consumo humano está regulada por la Directiva 80/778/CE del Consejo de 15 de julio de 1980, en la que se establece el valor límite de 50 mg/l para los nitratos, y de 0.1 mg/l para los nitritos. La legislación nacional que incorpora esta normativa es la Orden de 1 de julio de 1987, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis físico-químicos para las aguas de consumo público y posteriormente el Real Decreto 1138/1990 de 14 de septiembre de 1990, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público.

Aplicable a los cosméticos es la Directiva 82/368/CEE, que establece las condiciones en que puede ser empleado el nitrito sódico en la elaboración de estos productos, prohibiendo su empleo conjuntamente con aminas secundarias y/o terciarias u otras sustancias que puedan formar nitrosaminas. También la Directiva 92/86/CEE de la Comisión de 21 de octubre de 1992, que al adaptar al progreso tecnológico la Directiva 76/768/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en materia de productos cosméticos prohíbe el uso de ciertas sustancias, entre ellas las nitrosaminas.

Las nitrosaminas también se ven reguladas por la Directiva 93/11/CEE de la Comisión de 15 de Marzo, relativa a la cesión de N-nitrosaminas y compuestos N-nitrosables por las tetinas y chupetes de elastómero o caucho, en la que se establece el método de ensayo para asegurar un Límite de Detección de 0.01 mg de N-nitrosaminas cedidas/Kg de material analizado, y se fijan unos límites de 0.01 mg del total de nitrosaminas liberadas y 0.1 mg del total de sustancias nitrosables, ambas referidas por kg de material analizado.

- (1) IDA: Cantidad máxima de una sustancia que se recomienda ingerir al día. Se asigna sobre la base de un Nivel de No Observación de Efectos Adversos (NNOEA) derivado de ensayos toxicológicos para aditivos u otras sustancias que puedan representar un riesgo para la salud.
- (2) Cantidad residual en el punto de venta al consumidor final, expresada como NaNO_2
- (3) Expresada como NaNO_3
- (4) Cantidad residual, incluido el nitrito formado a partir del nitrato, expresada como NaNO_2