

Teneurs en nitrates et en nitrites des produits carnés: Cas des saucisses hot dog commercialisés sur le marché de Dakar

E. K. PENOUCOU¹, A. TEKO-AGBO¹, A. P. BEDEKELABOU¹, E. M. M. NIANG¹

(Reçu le 29/09/2020; Accepté le 27/01/2021)

Résumé

Le contrôle des nitrites et nitrates sous formes d'additifs utilisés en charcuterie s'avère nécessaire en raison de leurs effets néfastes sur la santé humaine malgré leurs utilisations incontournables en raison de l'innocuité microbiologique qu'ils confèrent aux PCSCV (Produits de Charcuterie de Salaison et de Conserves de Viande). Cette étude fut menée sur 32 échantillons (répartis en deux lots) constitués de saucisses Hot Dog et prélevés dans quatre supermarchés sélectionnés de façon aléatoire dans la ville de Dakar. Les extraits obtenus après l'extraction ont subis la procédure de dosage des nitrites et des nitrates (lot 1 uniquement) décrite dans le protocole du kit de dosage. Les valeurs obtenues après le calcul des teneurs en nitrites ont été comparées à la limite maximale autorisée pour cet ion dans la matrice d'étude par le *Codex Alimentarius*. 100 % des échantillons du lot 1 étaient non-conformes au regard de la norme Codex contre 25 % du lot 2. Au total 72% des échantillons analysés étaient non-conformes au regard de la norme du Codex. Ce travail affirme la nécessité de disposer d'un contrôle en vue de protéger la population face aux risques d'exposition.

Mots clés: Nitrites, Nitrates, Saucisses, Dakar

Nitrates and nitrites contents of meat products: case of hot dog sausages sold in the Dakar market

Abstract

The control of nitrites and nitrates in the form of additives used in sausages proves necessary because of their adverse effects on human health despite their unavoidable use because of the microbiological safety they confer on PCSCVs. This study was conducted on 32 samples (divided into two groups) consisting of Hot Dog sausages and taken in four supermarkets selected randomly in the city of Dakar. The extracts obtained after extraction were subjected to the nitrite and nitrate assay procedure (group 1 only) described in the assay kit protocol, and the values obtained after the calculation of the nitrite contents were compared to the maximum limit. This ion allowed in the study matrix by the *Codex Alimentarius*. 100% of the samples in group 1 were non-compliant with the Codex standard against 25% of group 2. A total of 72% of the samples analyzed were non-compliant with the Codex standard. This work asserts the need for control to protect the population from the risks of exposure.

Keywords: Nitrates, Nitrites, Sausages, Dakar

INTRODUCTION

Les nitrites et les nitrates sous forme d'additifs sont d'utilisation presque inévitable dans les PCSCV (Produits de Charcuterie de Salaison et de Conserves de Viande) malgré les risques cancérigènes et génotoxiques sur la santé humaine qui leurs sont associés (Magee et Barnes, 1967). Leurs permanentes utilisations en charcuterie se justifient surtout en raison du défaut de substances capable d'assurer à la fois tout comme eux, l'innocuité microbiologique, la couleur rouge et le goût aromatique aux produits. Afin de maîtriser ces risques associés à l'emploi de ces additifs, les pays européens ont strictement réglementé leurs utilisations et leurs teneurs dans l'eau et les aliments. Bien que les pays de l'UEMOA disposent de textes de portée générale sur le contrôle des produits alimentaires à l'instar de la Loi 66-48 du 27 Mai 1966 au Sénégal, ils ne disposent pas de textes de portée spécifique sur l'utilisation des nitrates et /ou nitrites dans l'eau de boisson et les aliments à l'exemple de la Directive 2006/95/CE du 5 juillet 2006 qui réglemente leurs utilisations sous forme d'additifs dans l'espace économique européen.

En raison de l'absence de contrôle des nitrates/nitrites dans les PCSCV au Sénégal, notre étude s'est proposée de déterminer les teneurs résiduelles de nitrates/nitrites dans ces produits vendus sur le marché dakarais.

Ce travail avait pour objectif de comparer les teneurs des nitrates et/ou nitrites utilisés comme additifs alimentaires dans les produits de charcuterie-salaison à celles autorisées par la norme du *Codex Alimentarius*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits concernés, échantillonnage et taille de l'échantillon

La matrice d'étude était constituée de saucisses Hot Dog de 200 g de marque Nafy produit par la Chaîne de Distribution Alimentaire (CDA), une société qui fabrique et distribue les produits de charcuterie au niveau national.

La taille de l'échantillon à prélever fut déterminée selon la base statistique de SCHWARTZ avec la formule:

$$n = \frac{t^2 \times p(1 - p)}{m^2}$$

n: taille minimale de l'échantillon égale à 20;

t: valeur fixe du niveau de confiance 95% correspondant à 1,96;

p: désigne la prévalence de non-conformité relevée par une étude réalisée sur le plan national et fixée à 15% pour cette étude vue qu'aucune valeur n'est disponible en notre connaissance;

m: marge d'erreur qui désigne le risque d'erreur c'est-à-dire la probabilité de laisser passer un échantillon non-conforme et qui a été fixée également à 15% en cohérence avec la prévalence.

32 échantillons répartis en deux (02) lots en fonction de l'ordre des achats a été prélevés dans quatre (04) supermarchés sélectionnés de façon aléatoire dans la ville de Dakar.

¹ Laboratoire de Contrôle des Médicaments Vétérinaires, École Inter-États des Sciences et Médecine vétérinaires, Dakar, Sénégal

Mode opératoire

Une inspection visuelle des étiquettes de l'emballage de la matrice d'étude a précédé la phase d'analyse proprement dite afin d'identifier le type de salaison nitrée et/ou nitraté utilisé.

Kit de dosage enzymatique des nitrates et nitrites

Le kit de dosage (référence: NITRATES-100C; N° de lot: 161121E; date d'expiration: 10/2017; stockage: 2-8°C) fourni par le laboratoire LIBIOS situé dans le département du Rhône en région Auvergne-Rhône-Alpes à Pontcharra-sur-Turdine (France) est conçu pour mesurer les nitrates dans la gamme de 2-44 ppm nitrates et sert également à déterminer les nitrites en suivant les instructions de la procédure des tests.

Il était composé des éléments suivants:

- *Un tampon* (25 mM KH_2PO_4 , 0,025 mM EDTA; pH 7,5): 3 tubes de 35 ml;
- *Réactif coloré n°1* (1% Sulfanilamide dans HCl 3N) en poudre: 1 flacon pour 60ml;
- *Réactif coloré n°2* (0.02% N-Naphthylethylenediamine dans l'eau désionisée): 1 flacon pour 60ml;
- *NADH* sous forme lyophilisée (environ 2 mM NADH par tube): 4 tubes dans une pochette avec dessicant;
- *Nitrate Réductase* (NaR) sous forme lyophilisée (1 unité par tube): 4 tubes dans une pochette avec dessicant;
- *Diluant enzyme*: 4 ampoules scellées en plastique de 1 ml;
- *Standard Nitrate* (440 ppm nitrates): 1 tube de 1,5 ml sous forme liquide;
- *Tubes microcentrifuges*: 6 tubes pour la préparation de la gamme standard nitrates.

Préparation des échantillons

Les échantillons une fois acheminés au laboratoire furent conservés à une température de 4°C jusqu'à leur préparation qui n'est que la phase d'extraction en vue de l'obtention des extraits (les extraits du lot 1 étaient préalablement dilués au dixième avant leur dosage) à utiliser pour le dosage. Deux (02) méthodes d'extractions ont été utilisées comme l'indique le tableau 1.

Principe de dosage du kit

Il s'agit d'un kit de détermination des nitrates basé sur la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme Nitrate Réductase (NaR) à l'aide d'un donneur d'électrons naturel NADH. Son principe est de faire réagir en milieu acide les nitrites avec le sulfanilamide et le dichlorure de N-(1-naphthyl) éthylenediammonium pour développer une couleur visible qui sera mesurée par spectrométrie à une longueur d'onde de 540 nm \pm 20nm.

Tableau 1: Méthodes d'extraction utilisées

Méthode d'extraction A	Méthode d'extraction B
- Broyage des échantillons	- Broyage des échantillons
- Prise d'essai: 2,5 g	- Prise d'essai: 5 g
- Homogénéisation avec EUP	- Homogénéisation avec EUP
- Ajustement du pH entre 8 et 8,5	- Agitation/10 min
- Bain-marie/15 min+refroidissement	- Décantation/10 min
- Ajout de 1 ml CR 1 et 1 ml CR 2	- Ajout de 1 ml CR 1 et 1 ml CR 2
- Centrifugation 4000 trs/10 min	- Centrifugation 4000 trs/10 min

EUP: Eau Ultra Pure; *CR*: Color Reagent

Dosage des ions nitrites et nitrates

Pour le dosage des ions, deux (02) prélèvements des extraits du lot 1 (20 échantillons) ont été effectués dans un tube réactionnel. L'un servant à la détermination de la teneur en nitrite et l'autre à celle des nitrates du fait que nous avons utilisé pour la lecture un spectrophotomètre de type Magellan for PR 4100 avec une plaque munie de puits de 200 μl . Seul le dosage des nitrites a été observé pour les échantillons du lot 2.

La procédure du test pour les deux (02) dosages consistait à:

- 1- Établir un «Blanc réactif» puis des standards dans des tubes réactionnels, chacun desquels on ajoutera le tampon du kit;
- 2- Ajouter 50 μl de la solution NADH dans chaque tube puis bien mélanger au vortex;
- 3- Ajouter 20 μl de NaR dans chaque tube pour démarrer la réaction puis mélanger au vortex;
- 4- Ajouter respectivement 500 μl de chacune des solutions color reagent 1 et color reagent 2 et bien mélangé au vortex;
- 5- Prélever 200 μl de chaque extrait ainsi que du blanc et des standards dans les puits;
- 6- Lire les absorbances à 550 nm au spectrophotomètre entre 10 et 30 min après la réaction de développement de couleur.

Les étapes 2 et 3 étaient uniquement observées pour les échantillons du lot 1 pour le dosage des nitrates.

Calcul, expression et traitement des résultats

Les densités optiques des standards et des échantillons obtenus suite à la lecture spectrométrique à la longueur d'onde 550 nm furent corrigées par soustraction de la densité optique du « blanc réactif » de ces valeurs. Les densités optiques corrigées ont servi à générer la courbe d'étalonnage d'équation de régression $y = 0,0005x - 0,0017$ validée avec un coefficient de régression de 0,96. Les concentrations des échantillons ont été estimées en se rapportant sur la courbe. Il s'est agi d'utiliser l'équation de régression pour y arriver. Il s'agit au fait des concentrations exprimées en Partie Par Million (ppm) qui correspond dans notre cas à l'unité mg/l étant donné que nous avons fait l'extraction d'une substance dans un milieu liquide. Or l'expression des limites maximales retenues dans les normes réglementaires est en mg/kg de produit. Pour aboutir à cette expression il faut appliquer la formule suivante:

$$\text{Teneur} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) \times \text{volume d'extraction (l)}}{\text{prise d'essai (kg)}}$$

Pour l'analyse de nos résultats, un certain nombre d'outils nous ont servis:

- Le logiciel EXCEL pour générer la courbe d'étalonnage et déterminer les concentrations des échantillons;
- Le test t-Student pour analyser les séries de concentrations des nitrates et des nitrites;
- Le test de Dixon pour détecter les valeurs aberrantes;
- Les normes et décret en vue de déterminer les conformités et les non-conformités: décret n° 2005-913 du 12 octobre 2005, Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viandes pour les informations sur l'étiquette et la norme du *Codex Alimentarius* pour les teneurs résiduelles en nitrates/nitrites.

RÉSULTATS

A l'inspection visuelle des étiquettes des emballages de la matrice d'étude, aucune indication n'a été retrouvée sur le type de salaison nitrée et/ou nitraté utilisé. Ceci a conduit au dosage des ions nitrites et nitrates dans les échantillons du lot 1 ce qui n'a pas été le cas pour le lot 2 du fait que les résultats du lot 1 ont donné une quasi nullité aux nitrates.

Les résultats des dosages et les limites maximales autorisées par le Codex dans les produits carnés sont présentés respectivement dans les Tableau 2 et 3. Ainsi Au regard de notre référentiel, 100% des échantillons du lot 1 étaient non-conformes contre 25% au lot 2, ce qui donnait une non-conformité globale de 72%.

DISCUSSION

Teneur résiduelle en nitrites des saucisses

Les teneurs résiduelles en nitrites des échantillons sont dépendantes des quantités incorporées. Toutefois cette dernière n'explique pas à elle seule la teneur résiduelle obtenue et les écarts observés entre les teneurs des échantillons du lot 1 et ceux du lot 2. En effet, pour la teneur en nitrites des échantillons, plusieurs paramètres sont mis en

causes en plus de la quantité d'incorporation. Il s'agit de la nature de la matrice d'étude, des conditions d'extraction et de la méthode de quantification qui ont été utilisées. L'European Food Safety Authority (EFSA) a montré en 2003 qu'il n'existait pas de relation directe et simple entre les quantités incorporées et les quantités résiduelles et que la diminution des nitrites résiduels dans les produits dépendait de la température de l'entreposage, du traitement thermique des produits carnés et de la présence d'autres composés comme l'ascorbate. De même, (Hill *et al.*, 1973) ont prouvé que dans les saucisses seuls 20 à 25 % des nitrites ajoutés sont détectables dans le produit fini après une conservation à 2-5°C pendant une semaine.

Nos résultats sont différents de ceux de (Mey *et al.*, 2014) qui mesurèrent au printemps 2011, les concentrations en nitrites dans les saucisses sèches fermentées et trouvèrent des concentrations qui s'échelonnaient depuis des valeurs non détectables inférieures à 0,66 mg NO₂/kg jusqu'à une concentration maximale enregistrée à 97,3 mg NO₂/kg. Cette différence peut s'expliquer par la nature des matrices ainsi que par notre méthode analytique utilisée. Pour les écarts observés entre les teneurs des échantillons des deux (02) lots, ceci peut s'expliquer par les méthodes d'extractions. L'extraction des échantillons du lot 1 fut réalisée en

Tableau 2: Résultats des dosages en nitrites

Échantillons	Teneur en nitrites (mg NO ₂ /kg)	Interprétation	Echantillons	Teneur en nitrites (mg NO ₂ /kg)	Interprétation
1	1920	NC	17	1240	NC
2	3760	NC	18	4640	NC
3	2920	NC	19	5640	NC
4	1680	NC	20	2480	NC
5	2200	NC	21	ND	C
6	>8800	NC	22	0	C
7	3520	NC	23	50	C
8	1800	NC	24	ND	C
9	1120	NC	25	ND	C
10	1680	NC	26	330	NC
11	4160	NC	27	110	NC
12	3440	NC	28	>440	NC
13	1560	NC	29	50	C
14	7520	NC	30	ND	C
15	1920	NC	31	ND	C
16	1440	NC	32	ND	C

NC= non-conforme, C= conforme, ND: Non Détectable

Tableau 3: Limites maximales autorisées par le Codex dans les produits carnés

Catégories d'aliments	Limite maximale (mg/kg)	Notes
Viande, volaille et gibier compris, transformée, traitée thermiquement en pièces entières ou en morceaux	80	1
		2
Viande, volaille et gibier y compris, transformée, coupée fin ou hachée	80	3
		4

milieu alcalin. Il semblerait que le milieu alcalin favorisait une meilleure extraction des ions nitrites. En effet, Ionescu *et al.*, (2006) ont obtenu des valeurs moyennes pour les nitrites libres et nitrites totaux qui ont été plus grandes au cas de l'extraction alcaline. Les extraits de nos échantillons étaient de couleur rouge mais surtout pour les échantillons ayant subi l'extraction par la méthode A. Or l'élément de dosage par le principe de Griess est un composé rouge qui est lu à la longueur d'onde de 540 nm. La coloration de nos extraits pourrait interférer avec celle du composé à doser et influencer considérablement les densités optiques observées. Ceci pourra également justifier les très grands écarts entre les deux lots d'échantillons.

Teneur résiduelle en nitrates des saucisses

Les échantillons du lot 1 ont été les seuls dans lesquels les nitrates ont été dosés. Vue la gamme de mesure du kit qui est de 2-44 ppm nitrates, une dilution au dixième a été observée afin de pouvoir déterminer les valeurs plus élevées. Selon le principe du kit, le dosage des nitrates est basé sur leurs réductions en nitrites par l'enzyme Nitrate Réductase (NaR) à l'aide d'un donneur d'électrons naturel NADH. Ainsi, pour déduire les densités optiques des nitrates des échantillons, il faut une soustraction entre celles des nitrites sans étapes de réduction et celles avec réduction. L'application de cette démarche de calculs est conditionnée par le type de spectromètre utilisé.

Pour nos analyses, le spectromètre utilisé était muni de plaque à puits. Ainsi deux prélèvements de chacun des extraits du lot 1 furent réalisés pour déterminer leur teneur en nitrites et en nitrates. Ensuite une analyse statistique des DO des nitrites sans étape de réduction et des nitrites totaux a été faite en vue de savoir s'il y a une différence significative entre les deux (02) séries de densité optique avant de procéder au calcul de soustraction. Le test t-student fut appliqué grâce au logiciel EXCEL au seuil de 5%. La P-value obtenue est $41,2 \% > 5\%$. Ce qui traduit ainsi une différence non significative entre les absorbances des nitrites sans étape de réduction et des nitrites totaux. La quasi nullité de la teneur en nitrates des échantillons du lot 1 nous a conduit à ignorer son analyse pour les échantillons du lot 2.

Il importe de rappeler que le test t-student n'a tenu compte que de 19 échantillons. En effet, l'absorbance de la DO nitrites de l'échantillon 6 (0,0853) dépasse celle de la plus grande concentration des standards (44 ppm) qui est de 0,0627. La gamme de mesure pour le kit étant comprise entre 2-44 ppm et la courbe d'étalonnage générée par des standards respectant cet intervalle, il en ressort que cette valeur reste imprécise. Cette absence de nitrates résiduels de nos échantillons semble justifiée car actuellement la salaison nitritée est pratiquée pour tous les produits qui sont rapidement fabriqués et rapidement vendus dont les chairs à saucisses (Durand, 2002). De plus, selon Diouf (2010), la salaison nitritée est le type de salaison le plus simple pour assurer d'emblée l'ensemble des fonctions technologiques souhaitées. De même, le délai d'au moins 3 jours entre la préparation et le dosage pourrait en être une raison même si les nitrates étaient utilisés car Banas et Lata (2006) affirmaient que le dosage des nitrates impose que la mesure soit réalisée dans les plus courts délais après le prélèvement car les nitrates peuvent rapidement être réduits en nitrites.

Conformité ou non aux normes du Codex des échantillons

La vérification des conformités ou non de nos échantillons avec la norme du *Codex Alimentarius* se justifie par le fait qu'en premier lieu le Sénégal en fait partie et les quantités maximales proposées par cette norme est inférieures à celles de l'Union Européenne pour la catégorie de notre matrice d'étude. En effet, récemment en 2016, le Food Chain Evaluation Consortium (FCEC) a montré que des quantités de nitrites inférieures aux limites européennes actuelles pourraient être suffisantes pour l'innocuité micro-biologique des produits carnés. Nos résultats dans leur ensemble présentent un taux de non-conformité supérieure à celui de conformité et peut se justifier par l'absence de contrôle de ces additifs dans les produits carnés au Sénégal et une non-observation des normes internationales par les professionnels de la charcuterie.

CONCLUSION

Rakansou (2007) montrait que seuls 4% au plus des produits de charcuterie importés au Sénégal sont constitués de saucisses. Or la population actuelle du Sénégal s'élève à 16342106 habitants et les quantités d'importation des produits de charcuterie en 2017 faisaient 310537 tonnes (MEPA, 2016); ce qui donne une quantité de 12421 tonnes pour les saucisses. En admettant que toute la population sénégalaise est la population à risque vu que notre matrice d'étude est Halal et en la considérant la seule vendue sur le marché dakarois, la consommation moyenne est de 2,082 mg/hbt/j. 72% des échantillons analysés étaient non-conformes à la norme du *Codex Alimentarius*.

Les teneurs en nitrites (à l'exception des échantillons 6 et 28) sont comprises entre 50 et 7520 mg/kg de saucisse. En considérant la consommation moyenne de 2,082 mg/hbt/j, la quantité journalière admise chez un individu est comprise entre 104,100 mg et 15,656 g. Ces valeurs comparées à la DJA établie par la JECFA (0-0,07 mg/kg/j) démontrent que le risque existe et est présent. Ces valeurs confirment la nécessité d'un contrôle de ces additifs dans les produits de charcuterie. Toutefois, un travail préalable doit être fait en vue d'établir une réglementation appropriée spécifiant les méthodes de dosage de ces différents ions. Pour ce qui est de notre étude, la méthode de dosage par le kit du laboratoire LIBIOS, son choix se justifiait par son coût accessible et du fait que son principe est le même que celui de la méthode normalisée NF ENV 12014-3 : 2005 approuvée par le CEN avec les réactifs qui sont quasi identiques.

RÉFÉRENCES

- Banas D. et Lata J.C. (2006). Les nitrates. UMR 8079 CNRS/ENGREF/Univ.p1-10.
- Diouf L. (2010). Dépistage des fraudes alimentaires dans l'utilisation du tissu conjonctif et des additifs dans la fabrication des produits carnés. Thèse de 3^{ème} cycle chimie, FST UCAD; Dakar
- Durand P. (2002). Définitions, réglementation et classification des produits de charcuteries et de salaison (10-46), In Technologie des produits de charcuteries et des salaisons. Paris: Lavoisier; Technique et documentation. 450 p.

EFSA (2003). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the microbiological Safety of Meat Products. *The EFSA Journal*, 14: 1-31.

FCEC (2016). Study on the monitoring of the implementation of Directive 2006/52/EC as regards the use of nitrites by industry in different categories of meat products. Food Chain Evaluation Consortium 2016.

Hill L.H., Webb N.B., Mongol L.D. et Adams A.T. (1973). Changes in residual nitrite in sausages and luncheon meat products during storage. *J. Milk Food technol.*, 36: 515-519

CODEX STAN 192-1995 (révision en 2018). General standard for food additives.

Ionescu A., Zara M., Aprodu I., Vasile A., Carac G. (2006). Monitoring des nitrites et nitrates résiduels des produits de viande salée avec le teste nitrite merckoquant. *Scientific study & research*, 4: 1-12.

Magee P. N., Barnes J. M. (1967). Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.*, 10: 163-169.

Mey E., Klerck K., Maere H., Dewulf L., Derdelinckx G., Peeters M-C., Fraeye I., Heyden Y.V., Paelinck H. (2014). The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Science*, 96: 821-828.

Rakansou D. (2008). Contribution à l'étude des caractéristiques chimiques du jambon cuit de bœuf commercialisé sur le marché dakarois. Thèse, *Med-vet* 35; Dakar.

Sénégal, Ministère de l'Élevage et des Productions Animales (MEPA) (2016). Rapport de revue Sectorielle [en ligne] Accès Internet: www.elevage.gouv.sn/MEPARapport-revue-sectorielle-2016.pdf page consulté le 21 février 2017.

Union Européenne. (2006). Directive 2006/52/CE du Parlement européen et du Conseil du 5 juillet 2006 modifiant la directive 95/2/CE concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants et la directive 94/35/CE concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires.