

00528  
25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA LA DETERMINACIÓN DE CONSERVADORES  
EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA  
ERIKA CORDERO MOSCOSA**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D.F.**

**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA ABRIL, 2003**

**A**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

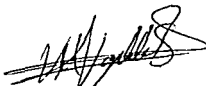
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>Prof. Eduardo Mendoza Martínez</b>
<b>Vocal</b>	<b>Profr. Hugo Rubén Carreño Ortiz</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof. Víctor Manuel Ugalde Saldívar</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Prof. Bertha Julietta Sandoval Guillén</b>
<b>2o Suplente</b>	<b>Prof. Edith Ponce Alquicira</b>

**Laboratorio Nacional de Salud Pública**



**Víctor Manuel Ugalde Saldívar**  
Asesor del Tema



**Juan Gerardo Ramírez Martínez**  
Supervisor Técnico



**Erika Cordero Moscosa**  
Sustentante

***A mi mamá por su fortaleza,  
respaldo y confianza.***

***A mi amor Felipe por su  
orientación, apoyo, paciencia y cariño.***

***A Victor ¡gracias! tus conocimientos siempre sembraron  
en mí un nuevo aprendizaje, tu impulso y empeño  
permitieron la terminación de este trabajo.***

## ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
3. Hipótesis	2
4. Antecedentes	
4.1 Aditivos	4
4.2 Conservadores	6
4.3 Ácido benzoico y benzoato de sodio	8
4.4 Ácido sórbico y sorbato de potasio	10
4.5 Análisis	13
4.6 Metodología	13
5. Diseño experimental	23
6. Resultados y discusión	
6.1 Análisis del método AOAC	33
6.2 Análisis de los procedimientos A y B	36
6.3 Comparación de procedimientos	41
6.4 Evaluación del método AOAC	42
6.5 Solubilización de conservadores	47
6.6 Incremento del número de extracciones	48
6.7 Incremento del número de extracciones en estándares	51
6.8 Evaluación del coeficiente de reparto	55
6.9 Optimización del método AOAC	60
7. Conclusiones	85
8. Recomendaciones	90
9. Apéndice	91

## **1. INTRODUCCIÓN**

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son una de las principales causas de enfermedad entre la población mundial, éstas contemplan tanto a las provocadas por la contaminación microbiana de los alimentos, que por regla general cursan de manera aguda, como las alteraciones a la salud, producto de la ingestión constante de ciertos contaminantes. El número de afectados por la ingestión de contaminantes de manera crónica no está cuantificado, se considera que la mejor manera de reducir las ETA es la prevención, entre cuyas medidas se encuentra la expedición de normas así como la vigilancia de su cumplimiento. La Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1\_1994, se presenta como una opción para disminuir las ETA causadas por el consumo de estos alimentos, que por su gran variedad, el bajo costo de varios de los productos incluidos y la forma en que son ofrecidos para su consumo en todo tipo de comercios dedicados a vender alimentos, son ampliamente consumidos entre la población. Por lo que si se desarrolla una norma y se hace una vigilancia adecuada del cumplimiento de ésta, la prevención será alta en términos tanto sanitarios como económicos. (NOM-122)

En general todos los alimentos deben estar sometidos a análisis cuantitativos de sus componentes. Estos análisis son registrados como Normas Oficiales y se aplican por los laboratorios de análisis. Uno de los parámetros a evaluar en el control de calidad dentro de los productos cárnicos, es la determinación cuantitativa de conservadores.

En el departamento de Productos Cárnicos del Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNSP), el análisis para conservadores se realizaba empleando el método recomendado por AOAC (Association of Official Analytical Chemist Methods of Analysis) 15a Ed., 1990, Vol. II (980:17) p. 1144. Sin embargo y dadas las características que presentan los productos cárnicos que se analizan en nuestro país se hizo necesaria la modificación de este método planteando dos procedimientos alternativos. Durante aproximadamente 4 años la evaluación de ambos procedimientos ha mostrado inconvenientes que repercuten en los valores de concentración durante una determinación. Alguno de estos inconvenientes es la presencia de grasa la cual favorece la formación de emulsiones entre la muestra y un solvente orgánico empleado durante un proceso de extracción.

Dado que no se cuenta con un procedimiento que asegure la confiabilidad de los resultados en el trabajo ordinario, se hace necesaria una revisión integral del método, para garantizar la calidad de los valores obtenidos.

## 2. OBJETIVOS

- Revisar las técnicas aplicadas en el Laboratorio Nacional de Salud Pública para la determinación de conservadores: benzoato de sodio y sorbato de potasio, en productos cárnicos.
- Determinar la confiabilidad de los valores obtenidos bajo las condiciones de trabajo seguidas con los métodos analíticos empleados en la determinación de los conservadores.
- Establecer sugerencias y / o recomendaciones para la determinación confiable de los conservadores en productos cárnicos.

## 3. HIPÓTESIS

- Los conservadores orgánicos, pueden extraerse de los alimentos aprovechando la propiedad que presentan de ser solubles en su forma ácida en disolventes orgánicos, por tanto el pH de la fase acuosa es un factor determinante para una extracción favorable.
- La relación de la concentración del soluto contenido en dos fases no miscibles (coeficiente de distribución), es una constante y cuando se incrementa el valor de ésta, incrementa también la concentración del analito a la fase orgánica.
- Algunos alimentos contienen sustancias como son las grasas, proteínas o algunos aditivos que pueden producir interferencias, estos pueden ser removidos empleando la adición de ácido metafosfórico o utilizando un solvente adecuado para evitar la formación de emulsiones.
- Los conservadores pueden ser identificados y cuantificados por espectroscopía de absorción en la región de ultravioleta siempre y cuando no exista interferencia espectral cuando dos solutos en estudio se encuentran presentes, si esto sucede deben ser cuantificados por determinación simultánea.

#### **4. ANTECEDENTES**

Todos los años se descomponen en el mundo grandes cantidades de alimentos de primera necesidad debido a la acción de los mohos, levaduras o bacterias, lo que no sólo puede perjudicar la reputación del fabricante y de todo el ramo sino también la salud del consumidor; algunos microorganismos producen toxinas, cuya toxicidad se ha conocido hasta hace poco tiempo.<sup>1</sup> Estas pérdidas y peligros pueden evitarse de forma considerable, aplicando procedimientos adecuados de conservación.<sup>2</sup>

Los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras), las enzimas propias de los alimentos y de los microorganismos y parásitos atacan a los componentes de los alimentos, bajo determinadas condiciones de humedad, temperatura, aire y acidez. Según esto, los distintos procedimientos de que se vale la tecnología para la conservación de los alimentos se pueden dividir en aquellos que en forma indirecta eliminan las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos y enzimas o los métodos directos que los destruyen por calor, aplicación de algún tipo de radiación o adición de productos químicos.<sup>3</sup>

La búsqueda de métodos satisfactorios para la preservación de alimentos ha sido un reto desde que el hombre comenzó a vivir en grupos, este reto vino a ser más grande conforme el hombre migro a áreas del globo donde la producción de alimentos era limitada a unos cuantos meses por año. La evolución a una sociedad industrial no ha disminuido el problema, cambios en las prácticas de agricultura, cambios en la dieta hacia productos perecederos incrementan la posibilidad de contaminación masiva a través del sistema de distribución. Ello implicó la búsqueda de métodos de conservación.

En todo el mundo el crecimiento de la crisis en el suministro de alimentos demanda que la pérdida debe ser reducida al mínimo, sobre todo en los países con grandes problemas nutricionales, en donde la producción, distribución, transportación y capacidad de preservación es inadecuada.

Mientras en los países altamente industrializados ha habido un desarrollo sustancial en las tecnologías de la preservación por calor, congelación, secado e irradiación, hay muchos alimentos a los cuales este proceso no puede ser aplicado o son solo parcialmente efectivos, es por esto que el uso de aditivos químicos, como un complemento a otros métodos, es esencial.<sup>4</sup>

Los conservadores se han empleado por siglos para prevenir la degradación microbiana de los alimentos y bebidas. La sal, el azúcar, el vinagre, las especias y el humo se han usado tradicionalmente como conservadores en varios países y en muchos tipos diferentes de alimentos. Sin embargo, estos ingredientes tienen un fuerte impacto en el perfil del sabor del alimento en el que se emplean.

Durante los últimos 100 años se ha progresado mucho en el desarrollo de conservadores químicos que no cambian el perfil de sabor en alimentos y bebidas.



Esto ha aumentado el uso de conservadores y reducido la incidencia de descomposición por microorganismos en nuestro abastecimiento de alimentos.<sup>5</sup>

#### 4.1. ADITIVOS

La aceptación de un alimento depende de múltiples factores entre los que destacan por su importancia el sabor, la textura, el color, el precio, el valor nutritivo, la vida de anaquel, la facilidad de preparación y en términos generales la apariencia de éste.<sup>4</sup>

Por otra parte, se sabe que los alimentos industrializados están constituidos por sustancias químicas propias de cualquier alimento como los hidratos de carbono, lípidos, proteínas, nutrimentos inorgánicos, vitaminas y agua, y que además pueden contener pequeñas cantidades de otras sustancias químicas consideradas generalmente como aditivos naturales y artificiales, cuya interacción determina en gran medida muchas de las características y propiedades de cada alimento.<sup>6</sup>

Es importante destacar que muchos de los avances tecnológicos de la industria alimentaria tiene relación con el empleo de aditivos, lo cual se ha venido incrementando de una manera considerable y por ello han sido el foco de atención de los últimos años por parte de los organismos reguladores. Por ello y para que los consumidores estén protegidos es necesario que exista un estricto control, para evitar su uso inadecuado.<sup>7,8</sup>

##### 4.1.1. Definición

De acuerdo con la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de los E.U.A. (FDA), un aditivo es una sustancia o mezcla de sustancias diferentes al alimento, que se encuentran en el mismo, como resultado de producción, almacenamiento o empacado, añadido intencionalmente para lograr ciertos beneficios como mejorar el nivel nutritivo, conservar la frescura, impedir el deterioro por microorganismos e insectos, generar alguna propiedad sensorial deseable o bien como ayuda de proceso.<sup>9</sup>

El uso de aditivos se debe limitar a las sustancias que han demostrado un beneficio al consumidor, este debe ser prácticamente no tóxico y debidamente evaluado en sus aspectos toxicológicos, para evitar riesgos para la salud.

Un aditivo no debe ser usado indiscriminadamente por el sólo hecho de que existe o bien para encubrir defectos en los alimentos, deben de usarse dentro de las normas nacionales e internacionales, ya que un exceso lo convierte en contaminante y no en aditivo, cometiendo un fraude para el consumidor.

Debido al riesgo toxicológico que pudiese implicar un aditivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como otras organizaciones internacionales para la agricultura y para la alimentación; por ejemplo (FAO) ha sugerido una ingesta diaria aceptable (IDA), con base al peso corporal del individuo, que representa la cantidad de

aditivo (u otro compuesto) en un alimento, que puede ser ingerido diariamente en la dieta, durante toda la vida, sin que este presente un riesgo para la salud humana, basándose en estudios de toxicidad aguda y prolongada. Además se debe aplicar un factor de seguridad que consiste en usar una concentración 100 veces menor respecto a la dosis en la cual no fueron detectados efectos adversos.

Al emplear un aditivo se debe considerar un balance entre riesgo y beneficio, el riesgo se define como la amenaza a la vida a la salud humana por el uso de químicos, mientras que los beneficios se pueden considerar en cuatro categorías:

- a) Para la salud y la nutrición humana
- b) Apariencia
- c) Conveniencia
- d) Proporcionar mayor disponibilidad de alimentos

En términos generales, al productor le representa un tiempo mayor de vida de anaquel; mientras que para el consumidor le puede significar menos desperdicios, así como seguridad en el consumo de alimentos.<sup>10,9</sup>

#### 4.1.2. Aspectos Legales

En relación con la legislación mexicana sobre aditivos, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, expedido en 1988, define como aditivos "aquellas sustancias que se añaden a los alimentos y bebidas, con el objeto de proporcionar o intensificar aroma, color o sabor, prevenir cambios indeseables o modificar en general su aspecto físico. Queda prohibido su uso para a) ocultar defectos de calidad; b) encubrir alteraciones y adulteraciones en la materia prima o en el producto terminado; c) disimular materias primas no aptas para el consumo humano; d) ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte; e) reemplazar ingredientes en los productos que induzcan a error o engaño sobre la verdadera composición de los mismos y f) alterar los resultados analíticos de los productos en que se agreguen".<sup>11</sup>

En este mismo documento se establecen los siguientes grupos de aditivos, de acuerdo con su función:<sup>12</sup>

1. Acentuadores de sabor
2. Acidulantes, alcalinizantes y reguladores de pH
3. Antiaglomerantes
4. Antiespumantes
5. Antihumectantes
6. Antioxidantes
7. Antisalpicantes
8. Colorantes y pigmentos
9. Conservadores
10. Edulcorantes sintéticos

11. Emulsivos, estabilizadores y espesantes
12. Enturbiaadores
13. Enzimas
14. Espumantes
15. Gasificantes para panificación
16. Hidrolizantes
17. Humectantes
18. Ingredientes para gomas de mascar
19. Leudantes
20. Oxidantes
21. Saboreadores y aromatizantes

#### 4.2. CONSERVADORES

En la industria alimentaria algunas veces se requiere la adición de ciertos compuestos químicos denominados conservadores y que se emplean para controlar el crecimiento microbiano.

De acuerdo a la FDA, los conservadores son preservativos químicos o cualquier otra sustancia química que al añadirse a un alimento tiende a prevenir o retardar su deterioro.<sup>3</sup>

En México de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios expedido en 1988, se define a los conservadores como la sustancia o mezcla de sustancias que previenen, retardan o detienen el proceso de la fermentación, enmohecimiento, putrefacción, acidificación u otra alteración de los alimentos, causados por microorganismos y por algunas enzimas y sólo se permiten:<sup>11,12</sup>

- Ácido benzoico y su sal de sodio
- Ácido sórbico y sus sales de sodio y de potasio
- Ácido propiónico y su sal de sodio y de calcio
- Agua oxigenada
- Acetato de sodio
- Dióxido de azufre
- Metil parabeno
- Nisina
- Nitrato de sodio o potasio
- Nitrito de sodio o potasio
- Propil parabeno
- Sulfito de sodio o potasio
- Metabisulfito de sodio o potasio

En lo referente a la industria cárnica, según la NOM-122, se permiten como conservadores; propionato de sodio, sorbato de potasio, propil parabeno y benzoato de sodio y especifica que la suma total de conservadores no podrá ser mayor a 0.1 % en peso.<sup>13</sup>

No cualquiera de estos conservadores es adecuado para todos los alimentos, ya que su efectividad depende de varios factores:

- a) Especificidad de acción; algunos tienen un espectro muy amplio de acción, mientras que otros son específicamente efectivos contra un determinado tipo de microorganismos.
- b) Composición del alimento; el pH, la fuerza iónica, la actividad acuosa, la disponibilidad de los nutrientes para los microorganismos, etcétera, son algunos de los parámetros que afectan igualmente la acción de los conservadores.
- c) Nivel inicial de la contaminación; los productos altamente contaminados no pueden controlarse con la adición normal de estos aditivos.
- d) Manejo y distribución del producto terminado; la conservación de los alimentos no sólo debe recaer en los aditivos, sino que se requiere de un manejo adecuado para evitar nuevas contaminaciones microbianas.<sup>14</sup>

#### 4.2.1. Modos de Acción de los Conservadores

La adición de sustancias químicas que favorece la conservación de un alimento debido en gran parte a su acción antiséptica y bacteriostática. El mecanismo de acción de gran parte de ellos es el ataque a la membrana celular de los microorganismos a la cual inactivan para los procesos de intercambio.<sup>15,10</sup>

Se sabe que los ácidos empleados en los alimentos retardan el crecimiento de microorganismos, sin embargo el efecto de los preservativos ácidos no puede atribuirse a su acidez ya que se trata generalmente de ácidos débiles como el ácido benzoico. Se conoce que es el compuesto no disociado el que actúa, o sea el que tiene un papel decisivo para el efecto del conservador.

Ácidos relativamente fuertes que pueden considerarse como conservadores son: tartárico, acético, láctico, que actúan principalmente debido a la disminución del pH de los alimentos.

Los ácidos más débiles como el benzoico, sórbico, propiónico, tienen un efecto que depende de la naturaleza antimicrobiana de la molécula no disociada.

Otros ácidos más fuertes como el sulfuroso, salicílico y fórmico tienen igual efecto, sin embargo son bastante tóxicos y no son permitidos en alimentos.<sup>3</sup>

#### 4.2.2. Requisitos de Uso de los Conservadores

Deben llenarse ciertas condiciones antes de considerar un preservativo químico para su uso en la industria de los alimentos, entre ellas están las siguientes:

- a. Prolongar la vida del alimento.
- b. No debe ser tóxico.

- c. No debe impartir sabor, olor, color, textura extraña, cuando se usen en los niveles requeridos.
- d. Debe ser fácilmente soluble.
- e. Debe presentar propiedades antimicrobianas en el intervalo de pH del alimento en que se usa.
- f. Debe ser económico y práctico de usar.
- g. El máximo de tolerancia de un aditivo en un alimento no deberá exceder de la centésima parte de la dosis que no ha surtido efecto aparente en las especies animales en las cuales ha sido probado.

Es preciso recordar que los microorganismos también se controlan mediante la reducción del pH y de la actividad acuosa, por lo que el vinagre, la sacarosa o el cloruro de sodio funcionan como conservadores.<sup>3</sup>

Dentro de la categoría de conservadores destacan los siguientes; benzoatos, parabenos, propionatos, acetatos, sorbatos, sulfitos, nitritos, nitratos, pirocarbonato de etilo y epóxidos. Excepto estos últimos, que tienen un efecto bactericida, todos los demás actúan fundamentalmente como inhibidores del crecimiento microbiano.<sup>4</sup> Dentro de los preservativos más usados en la industria de alimentos se encuentran; el ácido benzoico y benzoato de sodio, así como el ácido sórbico y sus sales.

### 4.3. ÁCIDO BENZOICO Y BENZOATO DE SODIO

La sal sódica del ácido benzoico (ácido bencencarboxílico o ácido fenilfórmico) se utiliza ampliamente en un gran número de alimentos. En forma natural, el ácido benzoico se encuentra en la canela, el clavo, las ciruelas en concentraciones de 0.05 % en peso. La forma no disociada del ácido es la que presenta actividad antimicrobiana, por lo que el pH tiene un efecto decisivo en su efectividad.<sup>4</sup>

#### 4.3.1. Propiedades físicas y químicas

El benzoato de sodio como un artículo comercial esta en la forma de hojuelas o polvo blanco este puede ser mezclado en ciertos líquidos y se disuelve rápidamente. La solubilidad en agua es de 50 g en 100 mL a 25 °C; la solubilidad en alcohol es de 1.3 g en 100 mL, en contraste con el ácido que tiene una solubilidad baja en agua de sólo 0.34 g en 100 mL. Es por eso que en su lugar se prefiere utilizar el benzoato de sodio cuya solubilidad es más alta y una vez dentro del alimento reacciona para formar el ácido correspondiente.<sup>16,17</sup>

#### 4.3.2. Actividad antimicrobiana

El ácido benzoico es generalmente considerado más efectivo contra levaduras y bacterias y menos activo contra hongos. Actúa óptimamente en el intervalo de pH de 2.5 a 4.0, este efecto se presenta porque en pH<4.0 (cuadro 1) existe una proporción alta sin disociar, que como se mencionó anteriormente es la forma que presenta actividad microbiana.<sup>17</sup>

**CUADRO 1. Efecto del pH en el grado de disociación de algunos conservadores (Porcentaje de ácido sin disociar)**

pH	Ácido sórbico (pka = 4.67)	Ácido benzoico(pka = 4.19)
3	98.00	94.00
4	86.00	60.00
5	37.00	13.00
6	6.00	1.50
7	0.60	0.15

En consecuencia el benzoato de sodio tiene una amplia aplicación como antimicrobiano en los productos ácidos como jugos de frutas, bebidas carbonatadas, almibar, ensalada de frutas, mermeladas, gelatinas, margarina con sal, carne picada, salsas, condimentos, pastel y rellenos de pastel. En alimentos fermentados controla el crecimiento de levaduras y bacterias y en menor grado el de hongos.<sup>18</sup>

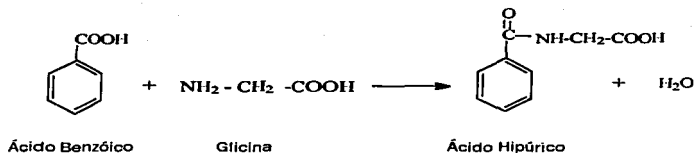
Se tienen informes de que a pH de 2.3 a 2.4 sólo se requiere de 0.02 a 0.03 % en peso de benzoato de sodio para prevenir el crecimiento de la mayoría de organismos de fermentación y entre pH de 3.5 y 4.0 el intervalo utilizado es de 0.06 a 0.1 % en peso para la mayoría de hongos de las frutas.<sup>4</sup>

#### 4.3.3. Seguridad para uso

Las pruebas de toxicidad aguda han mostrado que el benzoato de sodio es relativamente más tóxico que el sorbato de sodio. En estas pruebas las ratas que recibieron benzoato al 8% en peso de su dieta por un periodo de 90 días mostraron disminución en el peso y otros cambios fisiológicos los cuales no fueron observados en animales que recibieron 8% en peso de sorbato, además las investigaciones de la alimentación en humanos que se llevaron a cabo a principio de siglo XX por el departamento de agricultura de E.U.A. concluyeron que:<sup>4</sup>

1. El benzoato de sodio en pequeñas dosis (menos de 0.5 g/día) mezclado con los alimentos no muestra envenenamiento o deterioro en la salud.
2. El benzoato de sodio en altas dosis (arriba de 4 g/día) mezclados con los alimentos no ha mostrado efectos de deterioro en la salud general no actúa como un veneno en la aceptación de este término. En algunos casos fueron observadas modificaciones en ciertos procesos fisiológicos.<sup>4,19</sup>

Para ratas la dosis letal media de la sal es de 4.7 g/kg, vía oral. Estos compuestos no causan problemas de toxicidad en el hombre cuando se ingieren en las concentraciones que normalmente se permiten y se usan en los alimentos (0.05 al 0.1 % en peso), ya que se eliminan en la orina como ácido hipúrico (benzil-glicina) al reaccionar con la glicina en una reacción de detoxificación (esquema 1). Sólo cuando se consume de manera excesiva llega a provocar problemas de salud, que pueden llegar a producir convulsiones del tipo de la epilepsia.<sup>4,10</sup>



**Esquema 1. Reacción de detoxificación para ácido benzoico**

#### 4.3.4. Legislación

La Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de los E.U.A. reconoce al benzoato de sodio y ácido benzoico como seguros para su uso en alimentos, pero establece un nivel máximo de 0.1 % en peso. Es importante señalar que en otros países, es usado en niveles más altos como 0.2 y 0.3 % en peso, dependiendo del tipo de alimento.<sup>17</sup> En México se permite el empleo de éste conservador en cierto tipo de alimentos aun nivel máximo de 0.1 % (100 mg/100 g).<sup>13</sup>

#### 4.3.5. Aplicaciones

Como se mencionó anteriormente el benzoato de sodio es más adecuado para alimentos y bebidas con pH entre 2.5 y 4.0, su bajo costo es una ventaja, sin embargo puede impartir sabores desagradables a ciertos alimentos, y por ello se recomienda su empleo en bajos niveles o en combinación con otros antimicrobianos como el sorbato de potasio o ésteres del ácido parahidroxibenzoico.<sup>3</sup>

#### 4.3.6. Manejo y almacenamiento

El benzoato de sodio debe ser almacenado en un lugar frío y seco. Los recipientes deben ser ámbar por el efecto de la luz y deben mantenerse perfectamente cerrados, este producto no es corrosivo y bajo condiciones normales de uso presenta un ligero riesgo de inflamabilidad.<sup>4,8</sup>

### 4.4. ÁCIDO SÓRBICO Y SORBATO DE POTASIO

El ácido sórbico es un ácido graso insaturado que tiene propiedades fungistáticas. Se supone que la acción de este ácido como conservador se basa en la propiedad que tiene de unirse a las células microbianas, modificando la permeabilidad de la membrana y el metabolismo, pero también se ha sugerido que su estructura de dieno interfiere con el sistema enzimático de las deshidrogenasas de los microorganismos. Existen otros ácidos con instauraciones en el carbono α que ejercen acciones semejantes, igualmente se considera que el ácido sórbico está sujeto a reacciones de oxidación debido a su instauración, lo que produce radicales libres que

atacan la membrana de la célula e inducen a reacciones secundarias que inhiben el crecimiento microbiano.<sup>4,20</sup>

Se ha establecido que el ácido sórbico y el sorbato potasio actúan como preservativos efectivos en bajas concentraciones y en valores de pH menores a 6.5, por lo cual se usan para el control de hongos y levaduras que puedan formar compuestos indeseables en alimentos como quesos, productos horneados, jugos de frutas y vegetales, vinos, refrescos, salsas, carnes y pescado.<sup>21</sup>

#### 4.4.1. Propiedades físicas y químicas

**Ácido sórbico,  $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$ .** Es un polvo blanco cristalino y es sólo ligeramente soluble en agua (0.16 mg en 100 mL a 25 °C). En otros líquidos los miligramos que se disuelven a 20 °C en 100 mL de disolvente son: alcohol 14.8; propilen glicol anhidro 5.5; aceite vegetal 0.52. Para ser incorporado en material seco el ácido sórbico debe ser primero mezclada con almidón. Para disolverse en líquidos puede ser solubilizado con hidróxido de sodio o potasio o puede disolverse en propilen glicol o etanol para usarse como rociadores. El ácido sórbico sublima con el calor y puede ser destilado por arrastre de vapor.<sup>4</sup>

**Sorbato de potasio,  $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOK}$ .** Es un polvo blanco prácticamente inodoro y de granulado fino, que en comparación con el ácido sórbico es muy soluble en agua (139.2 mg en 100 mL a 20 °C). En alcohol su solubilidad es 2.0 mg en 100 mL. Esta sal fue desarrollada específicamente para la preparación de soluciones acuosas de referencia. Las soluciones de concentración relativamente alta son necesarias para envolturas, aplicaciones por aspersión e inmersión.<sup>21</sup>

#### 4.4.2. Actividad antimicrobiana

El ácido sórbico y su sal de potasio poseen mayor espectro de actividad contra levaduras y mohos; con respecto a las bacterias es menor. Su efectividad se encuentra hasta un pH de 6.5 y es aún mayor a pH menores.<sup>22,23</sup> Se ha encontrado que los sorbatos tienen mayor efecto que los benzoatos en la preservación de margarinas, quesos, pescados y pan. El metabolismo del ácido sórbico es similar al de los ácidos grasos, llevándose a cabo por  $\beta$ -oxidación.<sup>4</sup> En presencia de altas cantidades de mohos, el ácido sórbico es metabolizado por éstos y por lo tanto el efecto inhibitorio cesa.<sup>20</sup> Se ha encontrado que algunos microorganismos como el *Penicillium roqueforti*, utilizan este ácido como sustrato y producen hidrocarburos que tienen olor a gasolina, se ha comprobado que esta transformación sucede en los quesos cuya superficie ha sido tratada con ácido sórbico.

El sorbato de potasio es la sal más usada porque se le ha encontrado un gran número de aplicaciones; en diferentes alimentos y en distintas condiciones se ha demostrado que controla el crecimiento de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Lactobacilos*, *Escherichia* y otros.<sup>4</sup>



Como se hizo mención anteriormente para su acción tienen la propiedad de unirse a la superficie de las células microbianas modificando la permeabilidad de la membrana y por tanto el metabolismo. El otro mecanismo de inhibición se fundamenta en el hecho de que el ácido sórbico está sujeto a reacciones de oxidación produciendo reacciones secundarias que inhiben el crecimiento microbiano.<sup>20</sup>

#### 4.4.3. Seguridad para uso

Este ácido y su sal de potasio se usan en una concentración menor de 0.3 % en peso. La dosis letal media del ácido es de 7.3 g/kg por suministro oral para ratas. No es tóxico para el hombre ya que éste lo metaboliza como cualquier otro ácido graso por medio de reacciones de  $\beta$ -eliminación a dióxido de carbono y agua.<sup>19</sup> Experimentos efectuados con animales han demostrado que éstos pueden tolerar concentraciones hasta de un 8 % en peso en el alimento, lo cual ha ocasionado que muchos investigadores lo citen como inofensivo.

En un estudio comparativo sobre la toxicidad del ácido sórbico y benzoato de sodio se ha observado que:

El ácido sórbico fue mejor tolerado que su sal de sodio, debido a su velocidad de absorción.

Comparando en ratas niveles de 1, 2, 4, 8 % de ácido sórbico o benzoato de sodio en sus dietas por 90 días se tuvieron los siguientes resultados:<sup>4</sup>

1. No se observaron efectos adversos en ratas alimentadas con ácido sórbico en ninguna de las concentraciones.
2. Con concentraciones de benzoato al 4 % no se observaron efectos dañinos.
3. En concentraciones del 8% con benzoato, el 40 % de las ratas no sobrevivieron y el 60 % restante, disminuyeron en un 66 % su peso y presentaron crecimiento anormal de hígado y riñones con respecto a las ratas testigo.

#### 4.4.4. Legislación

El ácido sórbico y sorbato de potasio son reconocidos como seguros para el uso en los alimentos bajo las normas de la Administración de Alimentos y Medicamentos de E.U.A. Se establecen límites para el uso de sorbatos en cierto tipo de alimentos en una concentración menor de 0.1 % en peso.<sup>20</sup> En México se permite el empleo de éste conservador en ciertos alimentos a un nivel máximo de 0.2 % (200 mg/100 g).<sup>11</sup>

#### 4.4.5. Aplicaciones

Por su gran actividad antimicrobiana los sorbatos se han sugerido como sustitutos de los nitritos y los nitratos que se usan en la curación de los derivados cárnicos, como salchichas, jamones, etcétera, también se han empleado soluciones al 5 % en volumen para rociar o sumergir piezas de distintos tipos de carne (pollo, res, etcétera) con lo cual se prolonga su vida de anaquel.

Dada la baja solubilidad del ácido en agua es preferible usar en su lugar los sorbatos que son más solubles. Se emplean en quesos, encurtidos, jugos de frutas, pan, vino, pasteles y mermeladas.<sup>4</sup> También se ha sugerido su empleo en la conservación de las tortillas de maíz, puesto que a nivel experimental se ha visto que incrementan considerablemente la vida de anaquel de este producto tan importante en México.<sup>5</sup>

#### 4.4.6. Manejo y almacenamiento

El ácido sórbico y el sorbato de potasio deben almacenarse a temperaturas por debajo de 37°C. No deben ser expuestos ni a luz ni al calor. Los recipientes empleados para su almacenamiento deben cerrarse perfectamente. Cualquier tipo de tela, papel u otro material absorbente que este en contacto con soluciones de sorbatos puede arder espontáneamente y por ello se recomienda que se mantenga a parte de los materiales celulósicos. Ambos pueden causar irritación a los ojos.<sup>4,21</sup>

#### 4.5. ANÁLISIS

Un método de análisis de benzoato de sodio y sorbato de potasio en productos cárnicos se encuentra en los métodos oficiales de análisis de la AOAC (Official Methods of Analysis) 15a Ed., 1990, Vol. II (980:17) p. 1144.

El análisis para la determinación de conservadores se realiza en una solución acuosa que contiene a los conservadores en forma de sal, con adición de ácido clorhídrico para dar los correspondientes ácidos que en contacto con el solvente orgánico son extraídos cuando se realizan dos extracciones sucesivas de 25 mL con éter de petróleo, la fase acuosa se desecha y la fase orgánica se recibe en un matraz volumétrico de 50 mL y se completa hasta el aforo con el solvente. De esta fase se obtiene el espectro electrónico de absorción en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 300 nm, se toma la lectura de absorbancia a 250 nm para ácido sórbico y 225 nm para ácido benzoico. La cuantificación de los conservadores se realiza con una curva de calibración que se construye a partir de las sales de benzoato de sodio y sorbato de potasio.

#### 4.6. METODOLOGÍA

El método cuantitativo para determinar la concentración de la muestra problema de los conservadores se realiza por espectrofotometría de absorción en la región del ultravioleta.

Para llevar a cabo este método cuantitativo, primero se obtiene un espectro de absorción en la región del ultravioleta de las especies en estudio, posteriormente se selecciona la longitud de onda de máxima absorción con la cual se realizan las mediciones de absorbancia, ya sea de la bibliografía o por medio de un espectrofotómetro de haz doble con exploración. La absorbividad específica a cualquier longitud de onda es constante y constituye una característica inherente de la especie absorbente.

El valor numérico de la absorptividad específica determina la pendiente de la curva de calibración y afecta al intervalo de concentración en el que se realizan las determinaciones. Cuando están presentes diversas bandas de absorción, la banda que se selecciona debe considerar una longitud de onda que corresponda a la intensidad máxima de la fuente de luz y a una alta sensibilidad espectral del fotodetector. La banda de absorción no debe superponerse con las bandas de absorción del disolvente o contaminantes, incluyendo exceso de reactivos, que puedan estar presentes en la muestra.

#### 4.6.1. Disolventes

Los disolventes que se usan en espectrofotometría deben cumplir con ciertos requisitos para lograr resultados exactos y reproducibles. El disolvente seleccionado debe disolver la muestra y ser compatible con el material de las celdas, debe ser transparente en la región espectral de estudio. Para evitar una mala resolución y dificultades en la interpretación de espectros, no debe emplearse un disolvente para mediciones que estén cercanas o debajo del límite de corte ultravioleta; esto es, la longitud de onda para la cual la absorbancia del disolvente puro tiende a una unidad.

Una vez que se ha seleccionado un disolvente con base en sus características físicas y espectrales, es necesario considerar su pureza. La curva de absorbancia de un disolvente debe ser uniforme, esto es, sin exhibir picos de impurezas extrañas en la región espectral de interés.

#### 4.6.2. Extracción

La extracción líquido - líquido es una técnica de separación, en donde las fuerzas puestas en juego son fundamentalmente de tipo físico, basándose en la separación en procesos de distribución. Desde el punto de vista operativo, la extracción líquido - líquido puede realizarse mediante las técnicas simple, repetitiva y múltiple. La distribución líquido - líquido es un proceso de transferencia de una o varias sustancias desde una fase líquida a otra también líquida inmiscible con la primera.

El campo de aplicación de la extracción líquido - líquido es muy amplio, no sólo como técnica de separación sino también en otros aspectos de la Química Analítica, tales como en procesos de concentración de una especie previos a su determinación, cuando el método analítico utilizado no tiene la sensibilidad suficiente para detectar y/o cuantificar concentraciones bajas de dicha especie.

Para conseguir que el proceso extractivo sea satisfactorio, además de la selección adecuada de las condiciones técnicas de operación, la composición de las fases utilizadas desempeña un papel decisivo. Aunque se pueden emplear combinaciones de dos o más disolventes orgánicos inmiscibles, generalmente una fase es acuosa y otra orgánica.

Otro aspecto que tiene gran importancia en el proceso extractivo es el pH de la fase acuosa ya que, en muchos casos, de él depende que el soluto a separar se

encuentre en forma adecuada para que se transfiera a la fase orgánica. La fase orgánica es la que permite la separación de los solutos mediante contacto directo con la fase acuosa que inicialmente los contiene. El disolvente o disolventes orgánicos, utilizado como fase orgánica debe ser muy poco soluble en agua y no reaccionar con ella. También debe poseer otras características, tales como punto de ebullición bajo, presión de vapor y viscosidad moderadas, no debe formar emulsiones, buena estabilidad química y no presentar carácter tóxico.

Existe una variedad de condiciones técnicas para llevar a cabo el proceso extractivo, siendo necesario seleccionar las más adecuadas para conseguir la separación más completa posible del soluto libre de impurezas. Estas condiciones son: relación de fases, agitación, separación de fase y temperatura.

La relación de fases es el cociente entre los volúmenes de fase orgánica y acuosa. La duración y la intensidad de la agitación suelen ser en la mayoría de los procesos extractivos de treinta segundos de agitación para alcanzar el equilibrio de distribución.

Otro aspecto técnico a considerar es conseguir la separación completa de las fases en el menor tiempo posible con objeto de agilizar el proceso extractivo. Para ello hay que evitar la formación de emulsiones estables variando, si es necesario, algún componente del sistema como el agente salino, el modificador o el diluyente, o bien la concentración de alguno de ellos. En lo referente a la temperatura, normalmente la extracción se realiza a temperatura ambiente.

#### 4.6.3. Equilibrios de distribución

La extracción líquido - líquido se basa, como se indicó anteriormente, en un proceso de distribución de un soluto entre dos fases mutuamente inmiscibles. Por tanto, es un proceso que ocurre en un sistema ternario con dos fases. Según la regla de fases de Gibbs ( $F + L = C + 2$ , siendo F el número de fases, L los grados de libertad y C los componentes), a presión y temperatura constantes, el proceso extractivo sólo tiene un grado de libertad. Esto implica que en el equilibrio las concentraciones de soluto en las dos fases están relacionadas entre sí. La extracción está regida por la ley de distribución, propuesta inicialmente por Berthelot y Jungfleisch y desarrollada por Nernst, la cual establece que en el equilibrio, a presión y temperatura constantes, la relación de concentraciones de un soluto entre dos fases inmiscibles es constante, siempre que dicho soluto se encuentre en la misma forma en ambas fases.

Considerando el equilibrio:

$$\frac{A}{a} \Leftrightarrow \frac{o}{A}$$

donde A es el soluto distribuido entre la fase acuosa (a) y la orgánica (o), la constante termodinámica que rige este equilibrio se denomina constante de partición (o de reparto),  $^{\circ}D$ , su expresión es:

$$({}^{\circ}D) = \frac{(aA)_o}{(aA)_a}$$

siendo  $aA$  la actividad del soluto en cada fase.

Esta constante sólo se puede utilizar cuando la concentración total de soluto es muy pequeña ( $[A] \rightarrow 0$ ). En la práctica, en lugar de dicha constante, se utiliza la constante de distribución,  $D$ , que corresponde a una relación de concentraciones molares:

$$(D) = \frac{[A]_o}{[A]_a}$$

Ambas constantes se relacionan mediante los coeficientes de actividad del soluto ( $f_A$ ) en cada fase:

$$({}^{\circ}D)_A = (D)_A \frac{(f_A)_o}{(f_A)_a}$$

Para aplicar la constante de distribución es necesario que el soluto se encuentre en la misma forma química en ambas fases y que se alcance el equilibrio dinámico entre ellas.

La constante de distribución es proporcional a la solubilidad relativa del soluto en ambas fases pero no puede obtenerse directamente a partir de las solubilidades en ambas fases ya que el coeficiente de actividad del soluto es distinto en cada caso.

La proporción de soluto extraído en un sistema extractivo dado, depende no sólo del valor de la constante de distribución sino también de la relación de volúmenes de fase orgánica y acuosa utilizadas y de la técnica empleada para llevar a cabo la extracción.

Cuando los volúmenes de ambas fases no son iguales, el soluto se desplaza hacia la fase cuyo volumen es mayor; por ejemplo si se considera una concentración inicial de soluto  $C_o$  en un volumen  $V_a$  de fase acuosa y se extrae con un volumen  $V_o$  de fase orgánica, una vez alcanzado el equilibrio, las concentraciones de soluto en las fases acuosa y orgánica serán  $C_1$  y  $C'_1$ , respectivamente:



Según el balance de materia:  $C_o V_a = C_1 V_a + C_1 V_o$  y la expresión de la constante de distribución:  $D = C_1/C_2$ . Sustituyendo  $C_1$  en función de la constante de distribución queda:

$$C_o V_a = C_1 V_a + DC_1 V_o = C_1 (V_a + DV_o)$$

de donde:

$$C_1 = C_o \frac{V_a}{V_a + DV_o} = C_o \frac{1}{1 + D\Phi}$$

siendo  $\Phi$  la relación entre los volúmenes de fase orgánica y acuosa ( $V_o/V_a$ ). De esta expresión se deduce que la concentración de soluto en la fase acuosa disminuye al aumentar la relación de volúmenes  $\Phi$ , es decir, el proceso extractivo es más efectivo cuanto mayores son la constante de distribución y la relación de volúmenes. Si  $\Phi = 1$ , la expresión anterior queda:

$$C_1 = C_o \frac{1}{1 + D}$$

Si se considera el caso inverso, de forma que inicialmente existe una concentración de soluto  $C_o$  en un volumen  $V_o$  de fase orgánica y se extrae con un volumen  $V_a$  de fase acuosa:

$$\frac{V_o}{V_a} \left[ \frac{C_o}{C_1} \right] \xrightarrow{\text{extracción}} \frac{V_o}{V_a} \left[ \frac{C'_1}{C_1} \right]$$

se llega a la expresión siguiente:

$$C'_1 = C_o \frac{1}{1 + \frac{1}{D\Phi}}$$

La relación de volúmenes acompaña a  $D$  como un factor multiplicativo en todas las expresiones en las que esta constante aparece, siempre que  $D$  esté dada para un sistema extractivo en el que la relación de volúmenes sea la unidad. Para conocer el rendimiento del proceso extractivo se utiliza el término factor de recuperación,  $R$ , que es la fracción o porcentaje ( $R_A$ ) de la cantidad de sustancia extraída, generalmente en la fase orgánica, bajo unas condiciones determinadas. Su expresión es:

$$R_A = \frac{p_A}{q_A}$$

siendo  $p$  la cantidad de  $A$  que ha pasado a la fase orgánica y  $q$  la cantidad de  $A$  presente inicialmente en la fase acuosa. A este término, es conocido como eficacia o rendimiento de la extracción y es expresado por  $E$ .

Si el factor de recuperación se expresa en función de la concentración inicial y final en fase acuosa, se obtiene:

$$R = \frac{\text{milimoles}_{\text{extraídos}}}{\text{milimoles}_{\text{iniciales}}} = \frac{C_o V_a - C_1 V_a}{C_o V_a} = 1 - \frac{C_1}{C_o}$$

Como

$$\frac{C_1}{C_o} = \frac{1}{1 + D\phi}$$

sustituyendo, queda:

$$R = 1 - \frac{1}{1 + D\phi} = \frac{D\phi}{1 + D\phi}$$

Esta expresión relaciona el factor de recuperación con la constante de distribución y con la relación de volúmenes de las fases. Cuando la relación de volúmenes es la unidad, la expresión se simplifica. En forma porcentual queda:

$$R_{\%} = \frac{D}{1 + D} \times 100$$

Despejando la relación de distribución, se obtiene:

$$D = \frac{R_{\%}}{100 - R_{\%}}$$

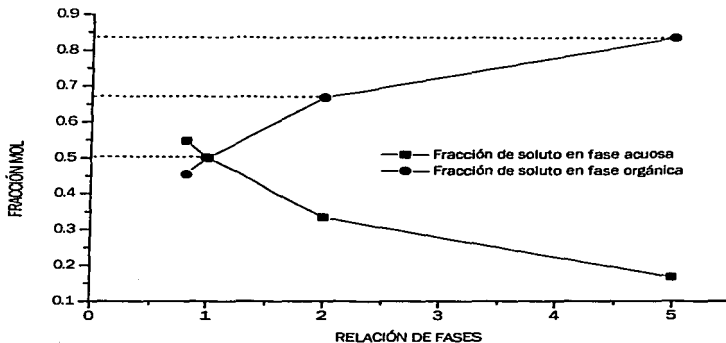
#### 4.6.4. Efecto de la relación de fases ( $\Phi$ )

La gráfica 1 muestra la variación de la fracción mol en fase orgánica y fase acuosa en función de la relación de fases, empleando las siguientes ecuaciones:

$$q = \frac{1}{1 + (D * \phi)} \qquad p = 1 - q$$

siendo  $q$  y  $p$  la fracción mol en fase acuosa y orgánica respectivamente,  $D$  el coeficiente de reparto (relación de la concentración de soluto en fase orgánica y fase acuosa) y  $\Phi$  la relación de volúmenes de fase orgánica y acuosa (Vorg. / Vac.). De esta

expresión se deduce que la fracción mol en la fase acuosa disminuye al aumentar  $\Phi$ , es decir, el proceso extractivo es mejor cuanto mayores son el coeficiente de reparto y la relación de fases. Si  $D = 1$  y  $\Phi = 1$  la distribución es del 50 % en cada fase, al incrementar  $\Phi$  a 2 la extracción es del 67 %, se observa que la extracción es del 85 % al incrementar el valor de  $\Phi = 5$ .



Gráfica 1. Efecto de la relación de fases ( $\Phi$ )

#### 4.6.5. Efecto de el cambio de pH

Una variable que desempeña un papel decisivo en los procesos extractivos de solutos con propiedades ácido-base es el pH de la disolución acuosa.

El equilibrio ácido base esta dado por:



$$K_a = \frac{|A^-||H^+|}{|HA|} ; |HA| = \frac{|H^+||A^-|}{K_a} ; |A^-| = \frac{K_a|HA|}{|H^+|}$$

La concentración condicional en fase acuosa es:



$$|A'|_{ac.} = |HA|_{ac.} + |HA|_{ac.} \frac{K_a}{|H^+|} = |HA|_{ac.} \left\{ 1 + \frac{K_a}{|H^+|} \right\}$$

El coeficiente de reparto condicional está está dado por:

$$D' = \frac{|HA|_{org.}}{|A'|_{ac.}}$$

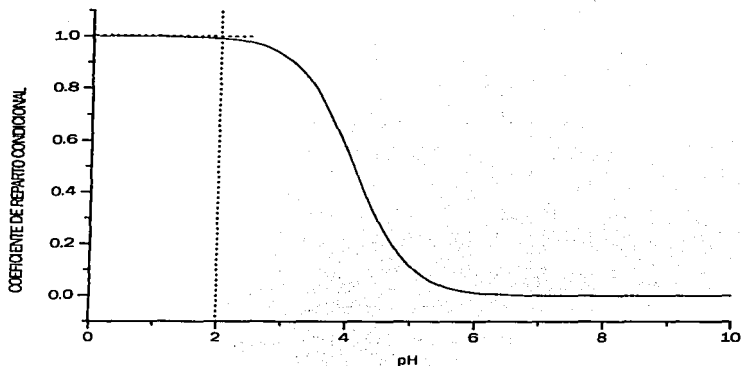
Sustituyendo la concentración condicional en la ecuación anterior:

$$D' = \frac{H_2A'_{org.}}{|HA|_{ac.} \left\{ 1 + \frac{K_a}{|H^+|} \right\}}$$

Por tanto el coeficiente de reparto condicional es:

$$D' = \frac{D}{\left\{ 1 + \frac{K_a}{|H^+|} \right\}}$$

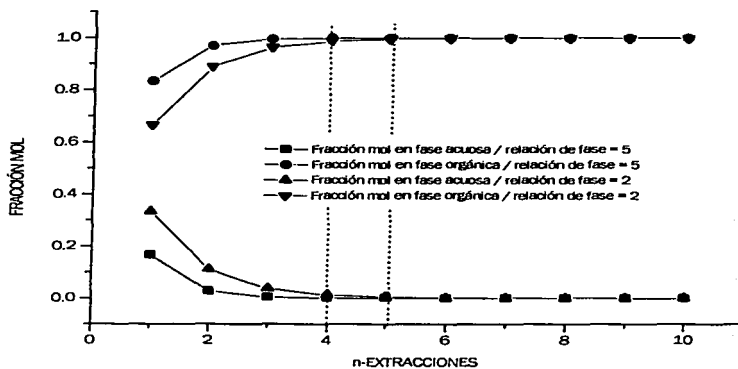
Dado que el coeficiente de reparto (D) puede ser un valor pequeño si el analito no se encuentra en el pH adecuado porque entonces la solubilidad del analito en el solvente orgánico disminuye, es decir en medio ácido la solubilidad de los analitos en el solvente orgánico es mayor y esto se favorece a pH = 1, por lo cual el coeficiente de reparto dependerá de esta variable. En la gráfica 2 se presenta un estudio teórico donde  $D = 1$  y  $\Phi = 1$ , para obtener  $D' = f(\text{pH})$ . De este estudio se observa que: en pH = 3 la curva decae a medida que el pH aumenta, hasta obtener un valor de coeficiente de reparto igual a cero en el intervalo de pH de 6 a 14, es decir no hay distribución a la fase orgánica porque el analito no es soluble en este intervalo de pH. Los valores de D son muy cercanos a 1 en el intervalo de pH entre 0 y 2, siendo esta la condición más favorable de trabajo. Al analizar el coeficiente de reparto en  $\text{pH} = 2$ , se observa que la gráfica comienza a presentar una disminución en el valor de  $D'$  haciendo menos cuantitativa la extracción.



Gráfica 2. Efecto del pH en el valor del coeficiente de reparto condicional

#### 6.4.6. Extracciones sucesivas

Hasta el momento se consideraron tres factores que definen el porcentaje de extracción que son relación de fases, coeficiente de reparto y pH, pero se conoce que en el proceso de extracción el número de extracciones que se realizan es un factor que define en cierta medida el porcentaje de extracción. Se puede hacer uso de él cuando la relación de fases ( $\Phi$ ) sea un valor pequeño o cuando el valor de D es también pequeño. En la gráfica 3 se muestra el efecto sobre la fracción de soluto en fase orgánica y fase acuosa en función del número de extracciones. Si se considera  $D = 1$  y  $\Phi = 2$  se necesitarían 5 extracciones para una extracción cuantitativa al 98%, pero si  $\Phi = 5$ , el número de extracciones necesarias para lograr la misma cuantitatividad puede disminuir a 4.



Gráfica 3. Variación en la fracción mol, de un analito en fase acuosa y fase orgánica en función de el número de extracciones para  $\Phi = 2$  y  $\Phi = 5$

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El análisis de conservadores en productos cárnicos; benzoato de sodio (NaBz) y sorbato de potasio (KSo) se realiza con dos procedimientos alternos en el Laboratorio Nacional de Salud Pública, a un método oficial que viene referido en AOAC (Official Methods of Analysis), 15a Ed., 1990, Vol. II (980:17) p. 1144 en consecuencia el presente trabajo tiene como objetivo la comparación de los dos procedimientos, con la finalidad de estandarizar el análisis para la determinación de conservadores y obtener resultados confiables. Por lo cual se expone el desarrollo del análisis de conservadores por el método AOAC, el cual se basa en extracciones y una determinación espectrofotométrica.

### 5.1. Preparación de la muestra

El análisis de conservadores en productos cárnicos, esta enfocado para los productos procesados como: salchichas, chorizo, jamón, mortadela, etcétera. La determinación experimental de conservadores se realiza a partir de una muestra de embutido, la cual recibe un tratamiento previo como a continuación se describe.

Muestra: jamón de pavo; 95 % libre de grasa.

- Información Nutricional por 100 g  
Proteínas: 14.5 g  
Grasas: 4.5 g  
Hidratos de carbono: 3.0 g

Para prevenir la pérdida de agua durante la preparación y subsecuente manejo, la cantidad de muestra mínima es 1 kg, el material molido debe ser guardado en recipientes de vidrio con tapas herméticas que lo protejan del aire y de la humedad.

- Molienda del embutido: Se remueve la cubierta y se pasa tres veces a través de un molino de alimentos con placas de aproximadamente 3 mm de abertura, se mezcla perfectamente después de cada molienda, para obtener un producto homogéneo. Para evitar la descomposición de la muestra, se mantiene en congelación a una temperatura de (-2 a -4° C).

### 5.2. Método de análisis

El análisis para la determinación de conservadores se lleva a cabo de acuerdo al método oficial de AOAC con una muestra del producto cárnico homogenizado que en contacto con agua permite la extracción de los conservadores de la masa cárnica, debido a su alta solubilidad en agua. De la fase acuosa que contiene a los conservadores en forma de sales de sodio o potasio se toma una alícuota que se acidifica con ácido clorhídrico (HCl), la acidez del medio (pH = 1.0) ayuda a la formación cuantitativa de los ácidos correspondientes. Bajo estas condiciones se realiza la extracción empleando una fase orgánica, aprovechando la mayor solubilidad de la forma ácida en disolventes orgánicos. La extracción con el solvente orgánico (éter

de petróleo) se lleva a cabo con dos extracciones sucesivas. En la primera extracción una vez que se mantienen en equilibrio ambas fases se retira la fase orgánica y la fase acuosa se pone en contacto con un volumen nuevo de fase orgánica. Las porciones de la fase etérea después de cada extracción se mezclan para realizar la determinación espectrofotométrica. Esta determinación se realiza en la región de ultravioleta en el intervalo de longitud de onda de 200 a 300 nm, empleando como blanco el que se obtiene bajo las mismas condiciones de trabajo pero sin muestra problema. Se registra el espectro electrónico de absorción y un máximo de absorbancia en 225 nm indica la presencia de ácido benzoico y en 250 nm de ácido sórbico.

El diagrama de bloques # 1, ubicado en el apéndice 9.1 muestra la descripción del método AOAC y del cual se identifican 5 etapas bases del procedimiento que son:

1. Extracción de los conservadores de la masa cárnica
2. Relación de fases
3. Acidificación del medio
4. Extracción con un solvente orgánico
5. Determinación espectrofotométrica

El método cuantitativo para determinar la concentración de la muestra problema se realiza por la técnica de espectroscopía electrónica en la región de ultravioleta, empleando el método de curva de calibración.

Las curvas de calibración se construyen de acuerdo al método oficial de AOAC a partir de diluciones de los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio en agua destilada, para obtener soluciones patrón a partir de las cuales se obtuvieron estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio a diferentes concentraciones, de cada estándar se toma una alícuota y se acidifica con ácido clorhídrico, para obtener el ácido correspondiente, se realizan dos extracciones con el solvente orgánico y la determinación espectrofotométrica, en donde se consideran como longitudes de onda de máxima absorbancia 225 nm para ácido benzoico y 250 nm para ácido sórbico de acuerdo con la información de la literatura. En el diagrama # 2 (apéndice 9.1) se describe el procedimiento de análisis que se sigue con los estándares.

Con los valores de absorbancia se construye la curva de calibración al representar gráficamente los valores de absorbancia contra concentración y por interpolación se determina la cantidad de conservador en muestras problema.

A continuación se describe la forma en que preparan las soluciones estándar, así como su equivalencia en porcentaje en peso que permite conocer la concentración de conservador en la muestra problema.

Para la construcción de la curva de benzoato de sodio se pesan 200 mg y se disuelven en 100 mL de agua destilada, se toman de esta solución patrón de 1 a 6 mL y cada uno se afora a 100 mL con agua destilada, de las seis soluciones estándar se toma una alícuota de 5 mL y se adicionan 0.4 mL de ácido clorhídrico 6 M para

obtener el ácido benzóico, se realizan dos extracciones sucesivas y se realiza la determinación espectrofotométrica.

De acuerdo al procedimiento antes descrito la concentración para 1 mL de solución patrón de benzoato de sodio será:

$$\left(\frac{200\text{mg}}{100\text{mL}}\right) * \left(\frac{1\text{mL}}{100\text{mL}}\right) * \left(\frac{5\text{mL}}{50\text{mL}}\right) = 0.002\text{mg/mL} = 2\text{mg/L}$$

Las concentraciones para la construcción de la curva de calibración tomando de 1 a 6 mL de solución patrón esta dada de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla de concentraciones para los estándares de benzoato de sodio

Solución Patrón (mL)	Concentración (mg/L)
1	2
2	4
3	6
4	8
5	10
6	12

Para la curva de sorbato de potasio se pesan 100 mg de la sal y se procede como en la preparación de la solución patrón y solución estándar de benzoato de sodio, se realizan las dos extracciones sucesivas con el solvente orgánico y la determinación espectrofotométrica. De ahí que la concentración para 1 mL de solución patrón de sorbato de potasio sea:

$$\left(\frac{100\text{mg}}{100\text{mL}}\right) * \left(\frac{1\text{mL}}{100\text{mL}}\right) * \left(\frac{5\text{mL}}{50\text{mL}}\right) = 0.001\text{mg/mL} = 1\text{mg/L}$$

Las concentraciones para la construcción de la curva de calibración tomando de 1 a 6 mL de solución patrón esta dada de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla de concentraciones para los estándares de sorbato de potasio

Solución Patrón (mL)	Concentración (mg/L)
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6

La determinación realizada para los conservadores debe ser reportada en porcentaje en peso, por tanto es necesario hacer la equivalencia de mg/L a la unidades correspondientes. De ahí entonces parte el siguiente análisis en donde se considera que una muestra de 20 g en peso contiene el 0.1 % de conservador (0.001 g conservador/g muestra), entonces la concentración en mg/mL para la muestra será:

$$\left(\frac{20\text{g}}{100\text{mL}}\right) * \left(\frac{5\text{mL}}{50\text{mL}}\right) * \left(\frac{0.001\text{gconservador}}{\text{gmuestra}}\right) = 2 \times 10^{-5} \text{g/mL} * \left(\frac{1000\text{mg}}{1\text{g}}\right) * \left(\frac{1000\text{mL}}{1\text{L}}\right) = 20\text{mg/L}$$

por tanto 20 mg/L es equivalente a 0.1 % en peso de conservador, cuando el peso de la muestra es de 20 g, por tal razón el método AOAC indica que cada punto de la gráfica de curva de calibración equivale a 0.01 % para benzoato de sodio y 0.005 % para sorbato de potasio.

**Tabla de porcentaje en peso para los estándares de benzoato de sodio**

Concentración (mg/L)	% En peso de conservador
2	0.01
4	0.02
6	0.03
8	0.04
10	0.05
12	0.06

**Tabla de porcentaje en peso para los estándares de sorbato de potasio**

Concentración (mg/L)	% En peso de conservador
1	0.005
2	0.01
3	0.015
4	0.02
5	0.025
6	0.03

Los porcentajes de conservador presentados en la tabla 3, equivalen a 0.01 % en peso por cada mL de solución patrón de benzoato de sodio lo cual corresponde a una concentración de 2 mg/L y 0.005 % en peso por cada mL de sorbato de potasio lo cual equivale a una concentración de 1 mg/L, de acuerdo con el método descrito por AOAC.

La consideración anterior esta dada para un peso de muestra de 20 g, cuando no es de 20 g es necesario realizar algunas consideraciones que involucren este dato. Por ejemplo si se analiza una muestra con un peso de 10 g, de la cual se determina una concentración con la curva de calibración de 4 mg/L =  $4 \cdot 10^{-6}$  g/mL de benzoato de sodio, el cálculo para conocer el porcentaje de conservador que contiene la muestra esta dado entonces es:

$$\left(4 \times 10^{-6} \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{50\text{mL}(V_1)}{5\text{mL}(V_2)}\right) \times \left(\frac{100\text{mL}(V_1)}{10\text{g}(m)}\right) \times 100 = 0.04 \frac{\text{g conservador}}{\text{g muestra}} = 0.04\% \text{NaBz}$$

de donde:

$V_1$  = volumen de diluyente

$V_2$  = volumen de alícuota de muestra

$V_3$  = volumen de solvente orgánico

$m$  = peso de la muestra

El método para la determinación de conservadores en productos cárnicos antes descrito ha sido referido del método AOAC, sin embargo el estudio de este análisis parte del hecho de que en el Laboratorio Nacional de Salud Pública se realiza el análisis de conservadores; benzoato de sodio y sorbato de potasio instrumentado modificaciones al método AOAC en cada una de las 5 etapas descritas previamente. De acuerdo a las modificaciones realizadas en cada una de las etapas, el LNSP trabajo con dos procedimientos alternos al método oficial. Debido a que la determinación de los conservadores en las muestras problema se realiza indistintamente con uno u otro procedimiento, los resultados obtenidos de porcentaje en peso de conservador son diferentes para una misma muestra de acuerdo con el procedimiento realizado. Lo cual hizo necesario definir bajo que método de análisis se determinan los conservadores con la finalidad de estandarizar el análisis y con ello los resultados, por esta razón se analizaron las variables modificadas del método.

El primer procedimiento al que se denomina A, se presenta en el diagrama de bloques 3 (apéndice 9.1) y se identifican modificaciones en las siguientes etapas:

**Etapas 1** que comprende: peso de muestra, volumen de diluyente, tiempo de reposo y filtración. La modificación en este caso es el peso de la muestra que cambia de 20 a 10 g.

**Etapas 2**, durante el proceso de extracción el volumen de fase acuosa cambia de 5 a 85 mL.

**Etapas 3**, la acidez de la fase acuosa cambia de  $\text{pH} = 1$  a  $\text{pH} = 2$ .

**Etapas 4**, durante el proceso de extracción el volumen de fase orgánica cambia de 25 mL a 50 mL. Se observa por tanto que la relación de fases ( $\Phi$ ) esta cambiando de 10 a 1.2. Una modificación adicional en esta etapa es la separación de fases, que se realiza adicionando etanol como antiemulsionante y recuperación del solvente orgánico en sulfato de sodio anhídrido ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) con el fin de eliminar agua.

**Etapas 5**, la determinación espectrofotométrica se realiza empleando longitudes de onda de 230 nm y 255 nm para ácido benzoico y ácido sórbico respectivamente, estos valores de longitudes de onda son los máximos que da el instrumento, a diferencia de los que vienen referidos en la literatura que son 225 nm y 250 nm respectivamente.

El segundo procedimiento alterno que realiza el LNSP al que se nombra procedimiento B, sigue de manera ordinaria como el método AOAC 5 etapas base, la diferencia de este procedimiento radica fundamentalmente en un paso adicional en la etapa 1, a fin de evitar el uso de etanol como antiemulsionante. La descripción siguiente de cada etapa en conjunto con el diagrama de bloques 4 (apéndice 9.1) muestra las diferencias al método AOAC.

**Etapas 1** el peso de la muestra cambia de 20 a 10 g con un volumen de fase acuosa de 120 mL y 2 mL de hidróxido de sodio 5 N con la finalidad de mantener los



conservadores en forma básica y evitar su extracción. Posteriormente se realiza la extracción de lípidos en la muestra con el solvente orgánico, para evitar la posible formación de emulsión en la extracción de los conservadores. En esta etapa la fase orgánica se desecha y la fase acuosa es adecuada a las condiciones de extracción como se muestra en las siguientes etapas.

Etapa 2 la fracción a extraer es de 120 mL

Etapa 3 la acidez del medio es a un pH = 2.

Etapa 4 la extracción con el solvente orgánico es con 2 porciones de 50 mL. Por tanto que la relación de fases ( $\Phi$ ) esta cambiando de 10 a 0.83 con respecto al método oficial. El uso de etanol como antiemulsionante se sigue adicionando y la recuperación del solvente orgánico se realiza en sulfato de sodio anhidrido ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) con el fin de eliminar agua.

Etapa 5 al igual que el procedimiento A la determinación se realiza a 230 nm y 255 nm para ácido benzóico y ácido sórbico respectivamente.

Cuando el análisis se realiza por los procedimientos A y B, el porcentaje de conservador se determina por interpolación con una curva de calibración construida con los estándares de ácido benzóico y ácido sórbico, los cuales se llevan a diferentes concentraciones empleando como disolvente éter de petróleo. El diagrama 5 indica la preparación de los estándares hasta su determinación por espectroscopía, en la cual se toma como longitud de onda de máxima absorción la que el instrumento indica como máximo, con la lectura de absorbancia para cada concentración se construye la curva de calibración.

El cálculo para el porcentaje en peso de conservador de una muestra analizada, que por interpolación en la curva de calibración fue de 10 mg/L de benzoato de sodio será:

$$(10 \text{ mg/L}) * \left( \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) * \left( \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 1 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$$

$$(1 \times 10^{-5} \text{ g/mL}) * \left( \frac{100 \text{ mL}(V_2)}{100 \text{ mL}(V_1)} \right) * \left( \frac{100 \text{ mL}(V_1)}{10 \text{ g}(m)} \right) * 1.18(F) * 100 = 0.012 \frac{\text{g conservador}}{\text{g muestra}} = 0.012\% \text{ NaBz}$$

donde: ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $m$ ), corresponden a las mismas condiciones planteadas para el cálculo del método AOAC

F = Relación de pesos moleculares (factor para convertir el peso equivalente de ácido a la sal correspondiente): 1.18 para NaBz y 1.34 KSo.

El cual esta dado por la relación de los peso moleculares (sal /ácido):

$$F_{\text{NaBz}} = 144.11(\text{g/mol}) / 122.12(\text{g/mol}) = 1.18$$

$$F_{\text{KSo}} = 150.22(\text{g/mol}) / 112.13(\text{g/mol}) = 1.34$$

Se puede entonces decir que en el LNSP se trabaja con dos procedimientos que son derivados del método oficial, un estudio comparativo con cada uno de ellos permitirá determinar cual es más confiable. Para lo cual es necesario revisar bajo una serie de análisis, algunos aspectos importantes que definirán si las modificaciones instrumentadas al método oficial favorecen en la determinación de conservadores.

A continuación se plantean los análisis realizados, que fueron diseñados con base a los antecedentes.

#### **Diagrama 6. Evaluación de lípidos**

Como se hizo mención el procedimiento B presenta una modificación importante al método oficial que es la eliminación de lípidos por medio de la adición de hidróxido de sodio y extracción con éter de petróleo. Bajo este análisis cada fase etérea se analizó por espectrofotometría, con la finalidad de obtener un espectro de absorción electrónico a fin de conocer la fracción de lípidos que son eliminadas bajo esas condiciones y saber cual es la importancia de esta modificación al procedimiento B.

#### **Diagrama 7. Patrón de referencia de lípidos**

La fracción de lípido extraída, pudo ser evaluada al ser comparada con un patrón de referencia de lípidos, el cual se obtuvo al poner en contacto directo la masa cárnica con el solvente orgánico y una determinación espectrofotométrica de la fase etérea.

#### **Diagrama 8. Evaluación de pH y relación de fases ( $\phi$ )**

Se conoce que el valor de pH de la solución acuosa a extraer es un factor que determina la fracción a extraer y esto es porque la forma ácida de los analitos en estudio son solubles en el solvente orgánico. Bajo este análisis se puede conocer el límite de pH en el que la solución problema deja de ser extraíble. A su vez este análisis permite conocer la influencia de la relación de fases al manejar dos cambios en el volumen de fase acuosa a extraer distintos al que utilizan los procedimientos A, B y el método oficial. La forma de conocer la variación estará dada por el porcentaje en peso obtenido para cada valor de  $\phi$ .

La evaluación de los análisis anteriores permitieron conocer como puede ser modificado un resultado a partir de un cambio en las condiciones planteadas, además se pudo conocer si son necesarias las modificaciones instrumentadas por el LNSP.

A fin de dar un sustento al procedimiento que se debe utilizar para la evaluación de los conservadores en el LNSP se propuso hacer una serie de análisis al método AOAC, con el objetivo de dar respaldo a cada etapa del proceso de análisis.

#### **Diagrama 9. Adición estándar en muestra problema**

Este análisis se basa en la incorporación de una fracción conocida del analito problema a una muestra cuyo porcentaje de conservador se conoce, para que después de analizar la muestra, por diferencia se conozca el porcentaje de extracción del estándar adicionado y en consecuencia definir la capacidad de extracción del solvente orgánico.

#### **Diagrama 10. Adición estándar en muestra libre de conservador**

La adición del estándar en una muestra libre de conservador tuvo como finalidad eliminar las interferencias por saturación del solvente a fin de conocer la capacidad de extracción del solvente y dar respaldo a la adición estándar en muestra problema.

Los resultados obtenidos a partir de los análisis realizados con los diagramas 9 y 10, dieron origen al diseño de otros procedimientos con la finalidad de sustentar resultados.

**Diagrama 11. Solubilización de conservadores contenidos en la masa cárnica. (etapa 1)**

La extracción cuantitativa de los conservadores se encuentra ligada a la solubilización completa de los conservadores de la masa cárnica, cuando este proceso es incompleto puede significar una determinación incorrecta, que puede ser atribuida o bien a la falta de capacidad del solvente o una solubilización incompleta, por tal razón este procedimiento fue diseñado para observar si la solubilización de los conservadores de la masa cárnica se lleva a cabo cuantitativamente, al realizar cinco lavados extras a la masa cárnica y cada fracción ser analizada llevando a cabo el proceso de extracción con éter de petróleo y una determinación espectrofotométrica.

**Diagrama 12. Incremento del número de extracciones sucesivas "n" en la etapa 4**

En el método AOAC la extracción de los conservadores se realiza con dos extracciones sucesivas de 25 mL. Con la finalidad de verificar la capacidad de extracción del solvente se propuso realizar 6 extracciones adicionales con porciones de 25 mL y se obtuvieron los espectros de absorción electrónica en fracciones de 50 mL.

**Diagrama 13. Incremento del número de extracciones sucesivas "n" en los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio**

La búsqueda de los factores que pueden intervenir en los resultados llevaron a realizar extracciones adicionales en los estándares, este análisis fue diseñado para observar si también en las extracciones de los estándares la determinación es cuantitativa. El análisis se realizó en los estándares llevando a cabo cuatro extracciones adicionales con porciones de 25 mL del solvente para ser analizadas en fracciones de 50 mL por espectroscopía de absorción electrónica.

Los análisis antes realizados permitieron definir las condiciones que favorecen una determinación confiable de los conservadores así como los parámetros que pueden intervenir para que el proceso de extracción sea cuantitativo, considerando como cuantitativo una extracción superior al 98 %.

De ahí que los resultados obtenidos de los análisis anteriores dieron la pauta para la búsqueda de una serie de modificaciones al método AOAC con la finalidad de tener un procedimiento que asegure la confiabilidad del análisis en la determinación de conservadores de productos cárnicos.

El procedimiento que se propone bajo el esquema del diagrama 14 (apéndice 9.1) es de forma general el análisis que fue planteado a fin de asegurar la confiabilidad de los resultados. Este procedimiento al que se definió como método AOAC con éter etílico muestra modificaciones en la etapa 1 en peso de la muestra de 20 g a 10 g y solubilización de los conservadores de la masa cárnica llevada a cabo con agitación magnética y aforando a 100 mL, dado que el método oficial supone que el 15 % es agua de la muestra su volumen final es 85 mL, otra modificación importante fue el cambio de disolvente para la extracción de los conservadores que se efectúa en la etapa 3. Para la elección de éste se consideraron 4 solventes que son empleados en procesos de extracción y aquel que no presentó interferencia espectral en el intervalo de longitud de onda de estudio, fue seleccionado para llevar a cabo la nueva propuesta de análisis.

Al proponer un nuevo procedimiento para la determinación de conservadores fue necesario realizar una serie de procedimientos bajo los siguientes diagramas de bloques a fin de dar respaldo a las nuevas modificaciones.

**Diagrama 15. Extracción de los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio para la construcción de curvas de calibración con éter etílico**

La construcción de las curvas de calibración se llevó a cabo con el nuevo solvente de manera ordinaria como indica el método oficial. Bajo este procedimiento se observó que los máximos de absorción de los estándares fueran los mencionados por la literatura.

**Diagrama 16. Incremento del número de extracciones sucesivas "n" en los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio con éter etílico en la etapa 4**

Para evaluar si durante la primera extracción se realizó una extracción cuantitativa, se llevó a cabo una extracción adicional con dos porciones de 25 mL con éter etílico y la determinación por espectroscopia se evaluó con la fracción de 50 mL.

**Diagrama 17. Incremento del número de extracciones sucesivas "n" en la etapa 4 con éter etílico**

Este análisis se basó al igual que cuando se empleó éter de petróleo en realizar extracciones adicionales a las que indica el método oficial, con el objetivo de observar si el solvente orgánico tiene capacidad de extracción, la determinación se realizó bajo un seguimiento con los espectros de absorción electrónica de la fase orgánica en fracciones de 50 mL.

**Diagrama 18. Solubilización de conservadores contenidos en la masa cárnica, (etapa 1)**

La muestra cárnica de doscho que se obtiene después de la solubilización con agua de los conservadores fue puesta en contacto con una nueva porción de agua y esa nueva fase siguió un nuevo proceso de extracción con el solvente seleccionado y determinación espectrofotométrica, para evaluar si con la primera solubilización se extraen de manera cuantitativa los conservadores del producto cárnico.

**Diagrama 19. Método optimizado de AOAC**

Los resultados obtenidos de los procedimientos que permitieron evaluar cada etapa con el nuevo solvente orgánico dieron origen a la nueva propuesta de método para el análisis de conservadores. Como consecuencia este procedimiento presenta de forma general las nuevas condiciones para una determinación confiable de los conservadores en productos cárnico. Al mismo tiempo permitió evaluar las condiciones que favorecen la disolución de los conservadores del producto cárnico a partir de la solubilización con un volumen mayor de agua o incremento en la temperatura.

**Diagrama 20. Determinación simultánea a partir de adición de estándares**

Cuando en una determinación espectrofotométrica se encuentran presente dos especies y una de ellas presenta interferencia espectral a consecuencia de una de las especies es necesario cuantificar por determinación simultánea debido a que hay una contribución adicional en la absorbancia. Este procedimiento tuvo la finalidad de cuantificar cual es la contribución por interferencia espectral y si es de considerar en el análisis cuantitativo. Para ello se realizaron mezcla de estándares de concentraciones conocidas, se procedió con el análisis de extracción con éter etílico y determinación espectrofotométrica, para después cuantificar por curvas de calibración y determinación simultánea. Así con los resultados obtenidos por ambos métodos de cuantificación y con las concentraciones conocidas de los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio se pudo determinar la contribución por interferencia espectral.

Los diagramas de bloques empleados para realizar el análisis de los conservadores se presentan en el apéndice 9.1.

Cada uno de los procedimientos realizados dieron una serie de resultados que permitieron dar origen al siguiente paso de cada análisis de ahí que el capítulo que a continuación se presenta sea el análisis y discusión de los resultados obtenidos de los procedimientos aquí presentados.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis del método AOAC

Recordemos que la determinación de conservadores se encuentra de manera oficial en un método de AOAC y que el presente trabajo tiene como objetivo definir bajo que procedimiento se realiza esta determinación, una vez que el Laboratorio Nacional de Salud Pública modificó este método dando pie a dos procedimientos. Por tal razón el principio de este análisis se basa en los resultados obtenidos con el método oficial para después hacer una comparación con los dos procedimientos que llevan a cabo el Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNSP).

El análisis de conservadores por el método AOAC se realizó en dos series, y en cada serie se analizaron 5 muestras con la finalidad de tener una serie de resultados que den confiabilidad al análisis, así como para realizar el estudio estadístico que dé respaldo a los resultados que a continuación se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Determinación por el método AOAC del porcentaje en peso de benzoato de sodio y sorbato de potasio

Serie 1			
Muestra	% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.104	0.076	0.180
2	0.104	0.070	0.175
3	0.108	0.083	0.191
4	0.103	0.081	0.184
5	0.104	0.087	0.191
Promedio	0.105	0.079	0.184
Intervalo de confianza	0.002	0.008	0.009
Desviación estándar	0.002	0.006	0.007

Serie 2			
Muestra	% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	%(p/p) Total
1	0.081	0.076	0.157
2	0.082	0.077	0.159
3	0.078	0.073	0.151
4	0.069	0.066	0.135
5	0.084	0.080	0.165
Promedio	0.079	0.074	0.153
Intervalo de confianza	0.008	0.007	0.014
Desviación estándar	0.006	0.006	0.012

Condiciones de trabajo: pH = 1, Relación de fases = 10, Número de extracciones = 2

En la siguiente tabla se agrupan los resultados de las dos series realizadas y de las cuales se obtuvo que el porcentaje en peso fue de  $0.169 \% \pm 0.054 \%$  (0.092 % en benzoato de sodio y 0.077 % para sorbato de potasio), este valor es del orden de

magnitud que establece la norma oficial mexicana NOM-122, sin embargo 0.169 % en peso (p/p) es un valor que sobrepasa el límite máximo de 0.1 % en peso.

**Tabla 1a. Método A.O.A.C. Porcentaje total de conservador de las series 1 y 2**

# Serie	% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.105	0.079	0.184
2	0.079	0.074	0.153
Promedio	0.092	0.077	0.169
Intervalo de confianza	0.045	0.009	0.054
Desviación estándar	0.018	0.004	0.022

La variación entre los porcentajes en peso de las dos series y que tienen como consecuencia un intervalo de confianza alto, puede deberse al etanol empleado dentro de la determinación como anti-emulsionante. La solubilidad en gramos por 100 mL de solvente para ácido benzoico es de 43 % en etanol y en éter de 33.3 %, para ácido sórbico las solubilidades son: 12.9 % en el etanol y 2.7 % en el éter y el etanol es miscible en agua. Por tanto al ser más soluble los ácidos en etanol y a su vez el etanol en agua, se presenta mayor solubilidad en la mezcla etanol-agua, lo que implica un arrastre del analito en estudio a la fase acuosa presentando una pérdida del analito en estudio. Esto es una consecuencia no considerada en el uso del etanol dentro de la determinación por el método oficial, su empleo no está estandarizado y en consecuencia los porcentajes en peso cuantificados son diferentes.

### 6.1.1. Análisis estadístico para la comparación de medias por el método AOAC

Sin embargo el estudio estadístico de pruebas de hipótesis de los valores promedios del porcentaje en peso cuantificado para las dos series muestra que:

Para determinar si la media de la serie 1 ( $x_1$ ) es igual a la de la serie 2 ( $x_2$ ) se hace uso de la prueba estadística  $t$  de student, la cual es aplicable cuando las desviaciones estándar de los dos métodos no son significativamente diferentes. Se define que dos desviaciones no son significativamente diferentes aplicando el estadístico de prueba  $F$  (de dos colas).

El valor de  $F$  experimental se calculó con la siguiente expresión:

$$F_{\text{exp.}} = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

La desviación estándar de la serie 1 es 0.007 % y de la serie 2 es 0.012 % por tanto:

$$F_{\text{exp.}} = \frac{0.012^2}{0.007^2} = 2.939$$

El valor experimental de F debe tener un patrón de referencia dado por un valor crítico de F ( $F_c$ ) para una prueba de dos colas que se determina en tablas considerando los grados de libertad [( $p, \ell =$  número de muestras ( $n - 1$ )] y el nivel de significación ( $\alpha$ ):

$$(g. I) F_{c(\alpha) = (4,4)} F_{c(0.05)} = 9.605$$

Como  $F_{exp.} < F_c$  no hay diferencia significativa entre las dos varianzas a un nivel de significación del 5 %.

Por tanto se puede aplicar la prueba estadística t mediante la cual se desea comprobar que no existe diferencia entre la  $x_1$  y  $x_2$ .

Los datos para esta prueba son :

$$\text{Serie 1: } x_1 = 0.184 \quad n_1 = 5 \quad S_1 = 0.007$$

$$\text{Serie 2: } x_2 = 0.153 \quad n_2 = 5 \quad S_2 = 0.012$$

La hipótesis nula es  $H_0: x_1 = x_2$

La hipótesis alternativa es  $H_a: x_1 \neq x_2$

Se necesita comprobar que  $d = (x_1 - x_2) \neq 0$

Entonces:

$$t_{exp.} = \frac{(x_1 - x_2)}{S * \left[ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]^{0.5}}$$

$$S^2 = \frac{[(n_1 - 1) * S_1^2 + (n_2 - 1) * S_2^2]}{[(n_1 + n_2) - 2]}$$

Los valores obtenidos para  $S^2 = 9.65 * 10^{-5}$  por tanto  $S = 0.0098$

El cálculo para  $t_{exp.} = 5$

El valor de  $t_c$  se determina de tablas con 8 grados de libertad ( $p, \ell = n_1 + n_2 - 2$ ) con un nivel de significación del 5 %:

$$(8) t_{c(0.05)} = 2.31$$

Como  $t_{exp.} > t_c$ ; se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y se acepta la hipótesis alternativa  $H_a$  es decir la media de la serie 1 es diferente a la media de la serie 2.



A partir de los resultados obtenidos del análisis estadístico se puede decir que no hay confiabilidad en el método ya que las medias son diferentes cuando no debería ser así dado que el análisis se realizó bajo las mismas condiciones y como se hizo mención la desviación puede provenir por el uso de etanol.

## **6.2. Análisis de los procedimientos A y B que realiza en el LNPS para la determinación de conservadores en productos cárnicos**

El análisis para determinar conservadores; benzoato de sodio (NaBz) y sorbato de potasio (KSo) en productos cárnicos, como se mencionó se realiza por un método oficial de AOAC, el haber involucrado modificaciones en el diagrama de análisis de este método, como lo hizo el LNPS derivó en la definición de dos procedimientos.

Definir bajo que método de análisis se determinan los conservadores con la finalidad de estandarizar el análisis y con ello los resultados, llevan al análisis de los dos procedimientos modificados del método AOAC.

Los cambios que presentaron los procedimientos A y B respecto del método oficial son; relación de fases ( $\Phi$ ) que se define como el cociente entre los volúmenes de fase orgánica y fase acuosa, este cambio fue realizado porque al determinar conservadores por el método oficial los porcentajes en peso cuantificados eran valores muy bajos comparados con el límite máximo de la NOM-122, la cual especifica que la suma total de los conservadores no podrá ser mayor a 0.1% en peso. La relación de fases en el método AOAC es  $\Phi = 10$  este valor fue modificado en el procedimiento A con  $\Phi = 1$  y en B,  $\Phi = 0.083$ .

Otra modificación fue el pH del medio acuoso, se sabe que para favorecer la extracción al solvente orgánico los conservadores deben ser extraídos en su forma ácida y a  $\text{pH} = 1$  la fracción de ácido formada es mayor que a  $\text{pH} = 2$ . Cuando se hizo el cambio en la relación de fases en los procedimientos A y B no se consideró que la adición de ácido clorhídrico (HCl) debía ser proporcional al volumen de fase acuosa utilizada, en consecuencia el pH del medio acuoso en estos procedimientos no se ajustó y en las nuevas condiciones el  $\text{pH} = 2$ .

Se observa que estas dos modificaciones son prácticamente similares para los procedimientos A y B. Pero una modificación más que se realiza es en el procedimiento B es la extracción de lípidos de la muestra que se lleva a cabo manteniendo el medio acuoso en medio básico, a partir de la adición de hidróxido de sodio (NaOH), permitiendo así mantener los conservadores en forma de sal y realizar la extracción de grasa de las muestras con el solvente orgánico sin que los conservadores sean extraídos. La eliminación de lípidos evitaría la formación de emulsiones estables y con ello el uso de etanol como anti-emulsionante. Los procedimientos A y B se presentan en los diagramas 3 y 4 respectivamente en el apéndice 9.1.

Al realizar estos dos procedimientos se obtuvieron los resultados que a continuación se presentan en las tablas 2 y 3, y de las cuales se observa que la cuantificación de conservadores; benzoato de sodio y sorbato de potasio en una

muestra cárnica de embutido, analizada por los dos procedimientos mostró que el porcentaje en peso ( $\% (p/p)$ ) (g conservador/100 g de muestra) por el procedimiento A fue de 0.011 % (0.008 % de benzoato de sodio y 0.003 % para sorbato de potasio) (Tabla 2) y por el procedimiento B 0.009 % (0.006 % de benzoato de sodio y 0.002 % de sorbato de potasio) (Tabla 3).

**Tabla 2. Procedimiento A. Porcentaje en peso de benzoato de sodio y sorbato de potasio**

Muestra	% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.008	0.003	0.011
2	0.008	0.003	0.011
3	0.007	0.003	0.010
4	0.008	0.003	0.011
5	0.008	0.003	0.011
Promedio	0.008	0.003	0.011
Intervalo de confianza	0.001	0.000	0.001
Desviación estándar	0.000	0.000	0.001

Condiciones de trabajo: pH = 2,  $\Phi = 1$ , Número de extracciones n = 2

**Tabla 3. Procedimiento B. Porcentaje en peso de benzoato de sodio y sorbato de potasio**

Muestra	% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.005	0.002	0.007
2	0.005	0.002	0.007
3	0.007	0.003	0.010
4	0.007	0.002	0.010
5	0.007	0.003	0.009
Promedio	0.006	0.002	0.009
Intervalo de confianza	0.001	0.001	0.002
Desviación estándar	0.001	0.001	0.001

Condiciones de trabajo: pH = 2,  $\Phi = 0.83$ , Número de extracciones n = 2

### 6.2.1. Análisis estadístico para la comparación de medias de los procedimientos A y B que realiza el LNSP

Comparando ambos resultados, el procedimiento A con un porcentaje en peso total de 0.011 %  $\pm$  0.001 % presenta una diferencia de 0.002 % de más que el análisis del procedimiento B con 0.009 %  $\pm$  0.002 % en peso total, esto define que el valor promedio de porcentaje en peso de conservador por el procedimiento B puede encontrarse dentro del valor promedio del procedimiento A, es decir que la media de A es igual a la media de B ( $x_A = x_B$ ). Por lo cual se propone realizar el análisis estadístico de pruebas de hipótesis con el objetivo de sustentar esta suposición.

Para determinar si la media de A ( $x_A$ ) es igual a la del procedimiento B ( $x_B$ ) se hace uso de la prueba estadística t de student, la cual es aplicable cuando las desviaciones estándar de los dos métodos no son significativamente diferentes. Se define que dos desviaciones no son significativamente diferentes aplicando el estadístico de prueba F (de dos colas).

El análisis estadístico se realizó bajo el mismo procedimiento en la sección (6.1.1) obteniendo los siguientes resultados:

La desviación estándar del procedimiento A es 0.001 % y la del procedimiento B es 0.001% por tanto:

$$F_{\text{exp.}} = \frac{0.001^2}{0.001^2} = 1$$

$$(g. l) F_{\alpha(n)} = (4,4) F_{\alpha(0.05)} = 9.605$$

Como  $F_{\text{exp.}} < F_{\alpha}$  no hay diferencia significativa entre las dos varianzas a un nivel de significación del 5%.

Por tanto se puede aplicar la prueba estadística t mediante la cual se desea comprobar que no existe diferencia entre la  $x_A$  y  $x_B$ .

Los valores obtenidos para  $S^2 = 1 \cdot 10^{-6}$  por tanto  $S = 0.001$

El cálculo para  $t_{\text{exp.}} = 3.16$

El valor de  $t_{\alpha}$  se determina de tablas con 8 grados de libertad ( $\varphi. \ell = n_1 + n_2 - 2$ ) con un nivel de significación del 5%:

$$(8) t_{\alpha(0.05)} = 2.31$$

Como  $t_{\text{exp.}} > t_{\alpha}$ ; se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y se acepta la hipótesis alternativa  $H_a$  es decir la media del procedimiento A es diferente a la media del procedimiento B.

Con esto se definió que el valor promedio de porcentaje en peso de conservador por el procedimiento B de 0.009 %  $\pm$  0.002 % no se encontraba dentro del valor promedio del procedimiento A, además los intervalos de confianza parecen indicar que el procedimiento A es más preciso que el procedimiento B ya que el intervalo de confianza en este procedimiento representa el 20 % del valor promedio y para el procedimiento A representa solo el 9.5 %, lo cual indica un menor intervalo de variabilidad.

Para comprobar esta hipótesis se hizo uso del estadístico de prueba F (de una cola) en donde la comparación de las desviaciones estándar de los dos métodos definen si el procedimiento A es más preciso que el procedimiento B.

Mediante la prueba de F se comprueba si la varianza ( $S^2$ ) de B es más grande que la del procedimiento A. Para ello se consideró el valor de F experimental de 4 y se determinó por tablas el valor de F crítica para una prueba de una cola, con 4 grados de libertad y una significación del 5% de ahí que  $F_{\alpha} = 6.388$ .

Como  $F_{\text{exp.}} < F_{\alpha}$  la varianza del procedimiento B no es significativamente mayor que la del procedimiento A; es decir no es más preciso el procedimiento A.

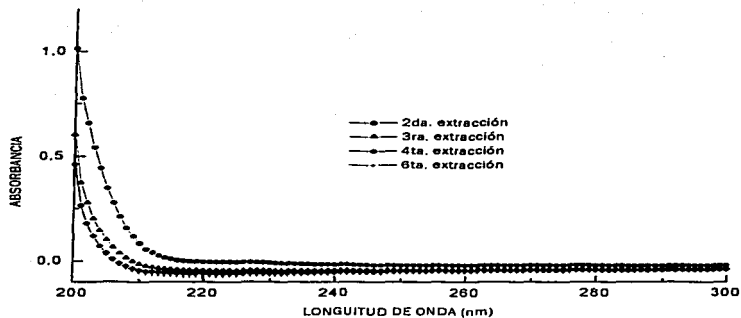
Las anotaciones que se pueden agrupar de las pruebas estadísticas son que:

- 1) La media del procedimiento A es diferente a la media del procedimiento B.
- 2) No existe diferencia significativa entre las dos varianzas.
- 3) No es más preciso el procedimiento A que el procedimiento B.

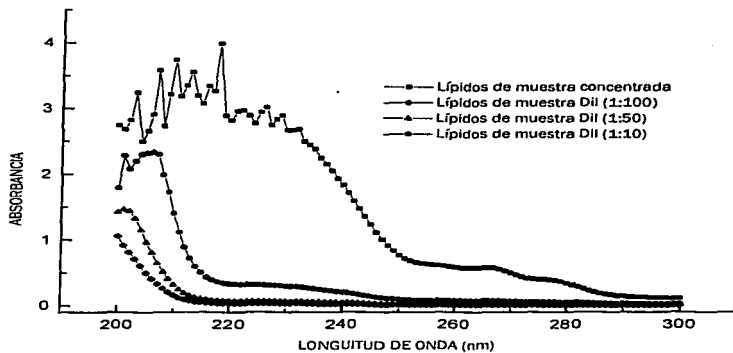
Dadas las anotaciones anteriores podría definirse que del análisis de los dos procedimientos, para definir bajo que procedimiento se determinan los conservadores, el procedimiento A podría ser más idóneo, considerando que el porcentaje total en peso obtenido es mayor que el del procedimiento B. Otro aspecto es el gasto de reactivo y el tiempo de análisis que resultaron menores para el procedimiento A con respecto al procedimiento B, en el cual el gasto del solvente orgánico es mayor debido a la eliminación de lípidos, este paso adicional aumenta el tiempo de análisis, sin que ello favorezca el proceso de extracción. Bajo estas condiciones se sigue presentando la emulsión corroborando que el procedimiento A es mejor que el procedimiento B.

### 6.2.2. Evaluación de lípidos

Para comprobar esta suposición se analizaron los espectros de absorción de la fase orgánica que contienen los lípidos extraídos y éstos mostraron que no hay eliminación cuantitativa de lípidos del producto cárnico. Este análisis se llevó a cabo cuando se adicionó hidróxido de sodio y se efectuó el proceso de extracción y cada fase retirada se analizó por espectroscopía (diagrama 6 – apéndice 9.1) obteniendo el espectro que se presenta en la figura 1a. La aseveración de que no hay eliminación de lípidos partió de la comparación, con un patrón de referencia de lípidos el cual fue obtenido al realizar la extracción con solvente orgánico de una muestra de producto cárnico, es decir se colocó una muestra del producto cárnico, se adicionó una porción de éter de petróleo y se mantuvo en reposo durante 10 minutos para después separar la fase orgánica y ser analizada por espectrofotometría (diagrama 7 – apéndice 9.1). Como se observó que la absorbancia registrada en el espectro era muy alta (figura 1b), fue necesario hacer diluciones, para obtener un patrón de comparación adecuado. A partir de las diluciones realizadas se observó que la dilución (1:100) de la figura 1b presenta un espectro electrónico similar a la segunda extracción de la figura 1a ya que en ambos la absorbancia máxima es de 1 en la longitud de onda de 200 nm y disminuye hasta cero en la longitud de onda de 210 nm, se puede observar también en la figura 1b los espectros de la tercera a la sexta extracción de grasa se encuentran por debajo de la dilución (1:100), esto demuestra que la extracción de lípidos en el procedimiento B no funciona como tal pues solo se extrae una centésima parte de los lípidos presentes.



(a)



(b)

Figura 1. Espectros eletrônicos de absorção de los lípidos disueltos en éter de petróleo: (a) extracciones sucesivas en medio acuoso básico y por extracción en producto cárnico (b).

### 6.2.3. Evaluación de pH y relación de fases ( $\Phi$ )

Ya que con los porcentajes en peso 0.011 % determinado por el procedimiento A y 0.009 % por el procedimiento B, solo determina una décima parte del valor esperado (0.1 %) de acuerdo a la NOM-122, se diseñó un análisis para dar justificación a estos resultados partiendo del hecho que la relación de fases y el pH del medio son variables que modifican el porcentaje de extracción (sección 4.6.4 y 4.6.5).

El análisis se realizó, cambiando la relación de fases ( $\Phi$ ) de 1 a 5 y ajustando el pH de 2 a 1, en una muestra de 10 g en donde la solubilización se realizó con 100 mL y la extracción se llevó a cabo con 4 porciones de 25 mL del solvente orgánico, para realizar la determinación en 100 mL, como se expuso en el diagrama 8 (apéndice 9.1).

Los resultados del análisis anterior se presentan en la tabla 4 y muestran que: el porcentaje en peso fue 0.064 % (0.042 % de benzoato de sodio y 0.022 % para sorbato de potasio). Si se toma como patrón de comparación el porcentaje en peso del procedimiento A que fue de 0.011 %, se tiene que este valor es 5.82 veces mayor que el del método A, esto indica que la relación de fases y el pH del medio si son variables que modifican la determinación.

Tabla 4. Porcentaje en peso de benzoato de sodio y sorbato de potasio

Muestra	% (p/ p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.043	0.021	0.064
2	0.045	0.023	0.067
3	0.039	0.021	0.060
Promedio	0.042	0.022	0.064
Intervalo de confianza	0.007	0.002	0.009
Desviación estándar	0.003	0.001	0.004

Condiciones de trabajo: pH= 1,  $\Phi = 5$ , Número de extracciones = 4

### 6.3. Comparación de los procedimientos que realiza el LNSP y el método oficial

Los resultados obtenidos de los análisis anteriores hicieron plantear que, si los procedimientos A y B provienen de las modificaciones realizadas al método AOAC, la comparación entre ellos era necesaria y el análisis mostraría la forma que influyen las diferentes condiciones empleadas.

Dos de las condiciones modificadas del método AOAC fueron: pH y relación de fases, variables que modifican el porcentaje de extracción, por una parte el coeficiente de reparto (D) puede ser un valor pequeño si el analito no se encuentra en el pH adecuado porque entonces la solubilidad del analito en el solvente orgánico disminuye. Respecto a la relación de fases se puede decir que es un parámetro que puede llegar a definir si una extracción es cuantitativa o no dependiendo del número de extracciones. Por tanto conociendo las variables que influyen en una extracción era de esperarse que los cambios realizados por el LNSP para incrementar la cuantificación de los conservadores y que derivaron en los procedimientos A y B no serían favorables, porque si la relación de fases mejora el proceso de extracción

cuanto más grande sea y se tiene que en el procedimiento A,  $\Phi = 1$  y en B,  $\Phi = 0.083$  al comparar estos valores de  $\Phi$  con el del método oficial, que es de 10, queda sustentado que la extracción es más cuantitativa con este valor y esto se observó con los porcentajes en peso que fueron en promedio una décima séptima parte del valor determinado por el método AOAC.

Esto indica que con el método AOAC se tiene una mayor cuantificación para los conservadores, las modificaciones que cambiaron la relación de fases a 1 y 0.083, el cambio de  $\text{pH} = 2$  y que dieron origen a los procedimientos A y B y en este último método también la supuesta eliminación de lípidos no contribuyen a mejorar el método AOAC.

Se puede decir por tanto que, el análisis para la determinación de conservadores por el método oficial, presenta las condiciones que favorecen a una extracción cuantitativa, las cuales son:  $\Phi = 10$  y  $\text{pH} = 1$ .

Estos análisis son respaldados con el estudio teórico que se presentó en los antecedentes (sección 4.6.4, 4.6.5 y 4.6.6) y del cual se pueden hacer las siguientes anotaciones: a  $\text{pH} = 1$  el coeficiente de reparto incrementa su valor y en conjunto con una relación de fases = 5, favorece a una extracción más cuantitativa con menos extracciones.

Ambos efectos, el  $\text{pH}$  y la relación de fases, son importantes para una determinación cuantitativa; sin el  $\text{pH}$  adecuado D puede adquirir un valor pequeño, pero la cuantificación puede mejorar con un incremento en la relación de fases o bien si  $\Phi$  y D son pequeños el número de extracciones puede ser una alternativa para una extracción cuantitativa. Hay por tanto tres variables que permiten una extracción cuantitativa y el valor de cada una define a otra:

- I. Coeficiente de reparto (D); que es un valor atribuido por el  $\text{pH}$  del medio.
- II. Relación de fases ( $\Phi$ ).
- III. Número de extracciones.

#### 6.4. Evaluación del método AOAC

Una vez determinado que el método oficial, es el procedimiento bajo el cual el análisis de los conservadores se debe realizar dado que presenta las condiciones para llevar a cabo una determinación cuantitativa, se consideró que había que dar respaldo al método realizando un análisis en el que se sustentará el porcentaje de extracción, de tal forma que se realizó la evaluación por el método de adiciones estándar.

##### 6.4.1. Adiciones estándar

El análisis de llevó a cabo con cinco muestras de producto cárnico; una muestra fue analizada convencionalmente, para ser tomada como punto de referencia del porcentaje en peso en muestra, a dos muestras más se les adicionó 0.05 % en peso

del estándar de benzoato de sodio y a las restantes 0.05 % de sorbato de potasio, de acuerdo como se describe en el diagrama 9 (apéndice 9.1).

Realizando cinco determinaciones, una con muestra problema solamente y cuatro con adiciones estándar, por diferencia se determina el porcentaje en peso de conservador que se recupera.

La tabla 5 muestra en (a) el porcentaje en peso de conservador de la muestra sin estándares, en (b) los porcentajes en peso de benzoato de sodio y sorbato de potasio después de incorporar el 0.05 % de estándar de benzoato de sodio, en (c) recuperación del estándar de NaBz y en (d) el porcentaje de recuperación.

**Tabla 5. Adición estándar de benzoato de sodio**  
**5a. Porcentaje en peso de muestra sin estándar**

% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K
0,049	0,038

**5b. Porcentaje en peso con adición de NaBz**

% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K
0,074	0,037

**5c. Recuperación por diferencia en porcentaje en peso**

% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K
0,025	0,001

**5d. Porcentaje de recuperación de NaBz**

Benzoato Na (%)	Sorbato K (%)
50	1

De la tabla 5 se hacen la siguientes anotaciones el porcentaje de recuperación para benzoato de sodio es del 50 %, el 1 % que se recupera de sorbato de potasio puede obedecer al error de análisis, se observa un corrimiento en el máximo de absorción a 228 nm tomando en consideración que el método oficial indica realizar la lectura en 225 nm, tal como se presenta en el espectro de absorción en la figura 2.



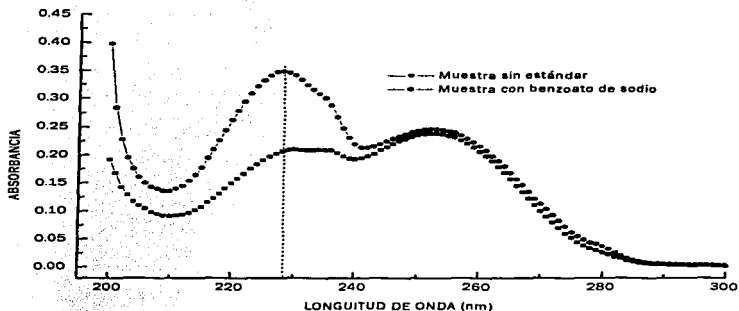


Figura 2. Espectros electrónicos de absorción de una muestra sin adición y con adición de estándar de benzoato de sodio.

Los resultados de la adición del estándar de KSo se presentan en la tabla 6 y muestran en (a) el porcentaje en peso de conservador de la muestra sin estándares, en (b) los porcentajes en peso de benzoato de sodio y sorbato de potasio después de incorporar el 0.05 % de estándar de sorbato de potasio, en (c) recuperación del estándar de KSo y en (d) el porcentaje de recuperación.

Tabla 6. Adición estándar de sorbato de potasio

6a. Porcentaje en peso de muestra sin estándar

% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K
0.049	0.038

6b. Porcentaje en peso con adición de sorbato de potasio

% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato k
0.050	0.057

6c. Recuperación por diferencia en porcentaje en peso

% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K
0.001	0.019

6d. Porcentaje de recuperación de KSo

Benzoato (%)	Sorbato (%)
1	37

Las observaciones que resultan de estos resultados son que el porcentaje de recuperación para sorbato de potasio es 37 %, que se presenta un corrimiento en la longitud de máxima absorción de 3 nm considerando que el método oficial indica un

máximo de absorción en 250 nm. Cuando se evalúa la recuperación para NaBz se determina un valor de 1 %, sin embargo a esta  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (figura # 3) el incremento en absorbancia es considerable por lo que se sugiere una interferencia espectral y también hay una recuperación del 1 % en NaBz, sin embargo no parece obedecer al error de análisis como se puede ver en el espectro de absorción (figura 3), este incremento es considerable en el máximo de absorción de NaBz, es decir se presenta interferencia espectral del sorbato en la determinación de benzoato.

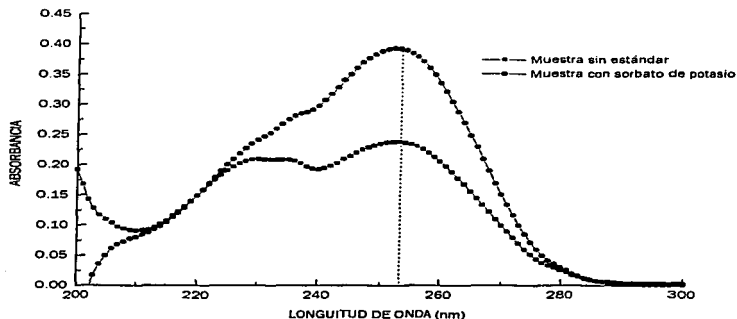


Figura 3. Espectros electrónicos de absorción de una muestra sin adición de estándar y con adición de sorbato de potasio.

Un aspecto importante en este análisis es el porcentaje de recuperación poco cuantitativo, ello puede obedecer a dos problemas; el primero a un coeficiente de reparto bajo y el segundo a una baja solubilidad de los conservadores del producto cárnico.

Considerar que la recuperación no fue cuantitativa y que el aumento es proporcional a la cantidad adicionada, hizo realizar una adición estándar más en una muestra libre de conservador, lo cual se consiguió realizando lavados en la masa cárnica con porciones de agua destilada a fin de extraer los conservadores (diagrama 10 – apéndice 9.1) es decir, la muestra se puso en contacto con una porción de agua por 10 minutos, como indica el método se filtro y el sólido (masa cárnica) se volvió a poner en contacto con una nueva porción de agua y así sucesivamente hasta obtener una muestra sin conservador, para determinar que la muestra estaba libre de conservador, cada fase acuosas recuperada después de los lavados, se analizó de forma usual por el método AOAC, es decir, acidificación y extracción en éter de petróleo, hasta que la muestra no presentó indicio de la presencia de conservadores en estudio (figura 4).

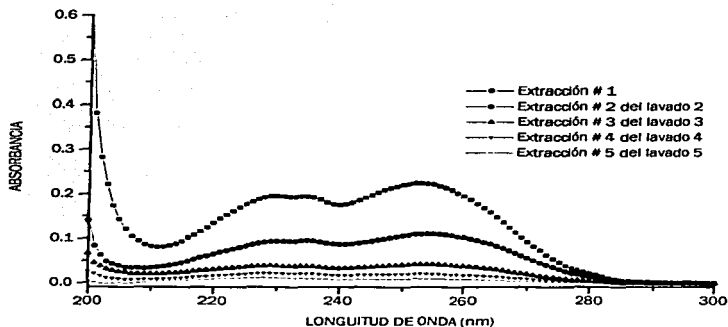


Figura 4. Espectros electrónicos de absorción de los lavados de una muestra de producto cárnico realizados para la eliminación de los conservadores, analizados por el método AOAC.

Con la muestra libre de conservadores se realizó una adición de estándar hasta alcanzar una concentración del 0.1 % en peso de benzoato de sodio. La muestra así preparada se analizó de acuerdo con el método oficial.

En la tabla 7 se presentan los porcentajes en peso de benzoato de sodio determinado en la muestra, así como el porcentaje de recuperación que representan del 0.1 % adicionado.

Tabla 7. Adición estándar con benzoato de sodio en muestra libre de conservador

Muestra libre de conservador con adición de 0.1 % de Benzoato de Sodio		
Muestra	% (p/p) Benzoato Na	% Recuperación
1	0.059	59
2	0.067	67
3	0.067	67
Promedio	0.064	64

Del resultado de la tabla 7 se puede ver que la recuperación fue del 64 %, este valor indica un incremento en la recuperación al eliminar el conservador que contiene la muestra en un inicio, parece ser entonces que se presenta saturación del disolvente lo que implica coeficiente de reparto bajo. Este análisis se planteó al realizar la comparación del porcentaje de recuperación obtenido con la primera adición de NaBz en muestra que fue del 50 %, se observa entonces un incremento del 14 % más, es decir hay una mayor recuperación porque el solvente orgánico se saturó menos debido a la eliminación del conservador de muestra, sin embargo permite indicar que también

faltó capacidad del solvente para extraer el analito, esto se define como se menciona al inicio de este análisis como un valor pequeño del coeficiente de reparto.

#### 6.5. Solubilización de conservadores contenidos en la masa cárnica, (etapa 1)

El otro factor que se menciona, que no permite una recuperación cuantitativa, es la solubilización del conservador del producto cárnico, para sustentar este aspecto se analizaron los espectros de la figura 4, que muestran el análisis por el método AOAC de las cinco porciones de agua destilada con las que se realizó la solubilización de los conservadores de la masa cárnica, es decir lavados; 1, 2, 3, 4 y 5.

Como se observa en los espectros de absorción cada lavado presenta absorción en la longitud de onda de máxima absorción de los dos conservadores en análisis, esto significa que los analitos no son totalmente solubles con la primera porción de agua de la muestra, la segunda porción es aún cuantitativa y parece ser el 50 % de la primera a simple vista y cada extracción es así el 50% de la que le antecede. Este análisis fue planteado desde la etapa anterior con la finalidad de dar respaldo a la hipótesis de que la solubilización era incompleta, estas observaciones de los espectros se definen con los porcentajes en peso cuantificados obtenidos a partir del análisis de cuatro muestras más como se planteó en el diagrama 1.1 (apéndice 9.1).

Los resultados del análisis de las cuatro muestras se presentan en la tabla 8a para benzoato de sodio y en la 8b para el sorbato de potasio.

Tabla 8. Porcentaje en peso de las extracciones realizadas a partir de las porciones empleadas para la solubilización de los conservadores de 4 muestras de carne  
8a. Benzoato de sodio

# Porción	% (p/p) Muestra 1	% (p/p) Muestra 2	% (p/p) Muestra 3	% (p/p) Muestra 4	% (p/p) Promedio
1	0.048	0.050	0.040	0.043	0.045
2	0.028	0.030	0.031	0.028	0.029
3	0.019	0.020	0.021	0.020	0.020
4	0.017	0.018	0.019	0.017	0.018
5	0.015	0.016	0.016	0.015	0.016

8b. Sorbato de potasio

# Porción	% (p/p) Muestra 1	% (p/p) Muestra 2	% (p/p) Muestra 3	% (p/p) Muestra 4	% (p/p) Promedio
1	0.037	0.037	0.031	0.032	0.034
2	0.020	0.021	0.022	0.020	0.021
3	0.011	0.012	0.013	0.012	0.012
4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
5	0.007	0.008	0.008	0.008	0.008

La tabla 8c contiene los promedios de todas las muestras, así como el porcentaje en peso total de conservador de los cinco lavados, cabe recordar que cada porción de agua resultado de los lavados, fue analizada de manera convencional por el procedimiento de AOAC, es decir acidificación y extracción con el solvente orgánico.

**8c. Porcentajes en peso promedio de los de conservadores en 4 muestras de carne analizadas**

# Porción	% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.045	0.034	0.079
2	0.029	0.021	0.050
3	0.020	0.012	0.032
4	0.018	0.009	0.027
5	0.016	0.008	0.024
Total	0.128	0.084	0.212

De la tabla 8c se tiene que; 0.212 % en peso es el 100%; entonces la porción 1 es el 37.3 %, la 2 el 23.6 %, la 3 el 15.1 %, la porción 4 el 12.7 % y la 5 representan un 11.3 %, de aquí entonces que si solo se realizara un lavado, con esta primera porción de agua existe un 62.7 % de conservador que no es cuantificable debido a la escasa solubilización de los conservadores.

Con los análisis de solubilización de los conservadores del producto cárnico y la adición estándar en una muestra libre de conservador, se abordaron los dos factores que no permiten una recuperación cuantitativa. Del primero se cuantificó un 37.3 % con las condiciones de trabajo del método AOAC lo cual representa no tener una condición adecuada de la solubilización de los conservadores del producto cárnico, del segundo factor se obtuvo un 64 % de recuperación e implica que la extracción; con dos porciones de 25mL que se hacen en la determinación no son suficientes, debido a un valor pequeño del coeficiente de reparto.

Un aspecto a considerar de estos resultados es el 0.212 % (p/ p) de conservador reportado de los cinco lavados es que si este valor se asume como el contenido total de conservador en muestra, no solo estaría fuera del límite que indica la NOM-122 sino que además representa el doble del límite máximo, lo cual respalda la importancia de una cuantificación correcta.

**6.6. Incremento del número de extracción sucesivas "n" en la etapa 4**

Al analizar que no son suficientes dos extracciones con 25 mL del solvente orgánico, porque el coeficiente de reparto es pequeño, se planteó este análisis en donde se efectúan extracciones adicionales en la etapa 4, es decir en el proceso de extracción con éter de petróleo, tal como se presentó en el diagrama de bloques 12 (apéndice 9.1), a fin de conocer el porcentaje en peso que se obtiene de una segunda, tercera y cuarta extracción de la alícuota inicial de 5 mL. Este análisis se llevó a cabo con las porciones de fase acuosa que quedaron después de la primera extracción de las 4 muestras de carne del análisis anterior, es decir a estas alícuotas siguieron tres extracciones más y se determinaron por espectrofotometría, obteniendo tres espectros adicionales (1a, 1b y 1c), que se muestran en la figura 5 y corresponden a una de las muestras analizadas.

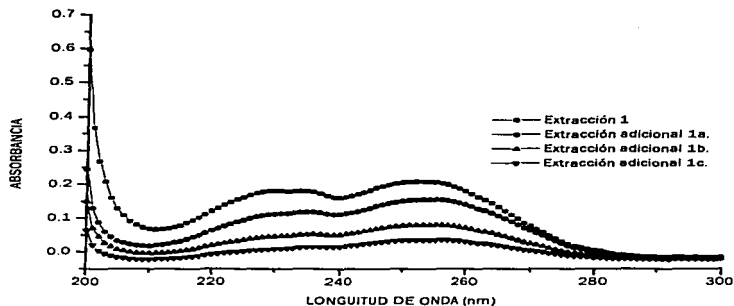


Figura 5. Espectros electrónicos de absorción de las extracciones adicionales a una alícuota inicial.

De la figura anterior se puede observar que se sigue presentando absorbancia en la longitud de onda de máxima absorción para ácido benzóico y ácido sórbico, es decir que aún después de la primera extracción es posible encontrar residuos de conservador en la fase acuosa.

Al realizar la cuantificación del análisis se obtuvieron los porcentajes en peso de conservador que se presentan en la tabla 9c y agrupan los promedios de las cuatro muestras de carne analizadas, los porcentajes en peso de cada muestra se presentan en la tabla 9a para benzoato de sodio y en 9b los de sorbato de potasio.

Tabla 9. Porcentaje en peso recuperado en las extracciones adicionales a alícuotas iniciales de 4 muestras analizadas por el método AOAC

9a. Benzoato de sodio

# Extracción	% (p/ p) Muestra 1	% (p/ p) Muestra 2	% (p/ p) Muestra 3	% (p/ p) Muestra 4	% (p/ p) Promedio
1	0.048	0.050	0.040	0.043	0.045
1a	0.032	0.032	0.033	0.031	0.032
1b	0.023	0.022	0.023	0.021	0.022
1c	0.018	0.016	0.019	0.014	0.017

9b. Sorbato de potasio

# Extracción	% (p/ p) Muestra 1	% (p/ p) Muestra 2	% (p/ p) Muestra 3	% (p/ p) Muestra 4	% (p/ p) Promedio
1	0.037	0.037	0.031	0.032	0.034
1a	0.025	0.026	0.026	0.025	0.026
1b	0.017	0.018	0.017	0.016	0.017
1c	0.012	0.012	0.013	0.011	0.012

**Tabla 9c. Promedios de los porcentajes en peso de las 4 muestras analizadas de la alícuota inicial**

Promedio de extracciones	% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.045	0.034	0.079
1a	0.032	0.026	0.058
1b	0.022	0.017	0.039
1c	0.017	0.012	0.029
Total	0.116	0.089	0.205

De la tabla 9c se tiene un porcentaje en peso total de las 4 extracciones de 0.205 %, considerando este valor como 100 % del conservador, en la extracción 1 se obtiene un 0.079 % en peso que representa el 38.54 % del total, en la extracción 1a se obtiene 0.058 % en peso que equivale al 28.3 %, la extracción 1b al 19 % y en 1c 14.15 %. Las anotaciones que se derivan de este análisis de resultados son que cada extracción adicional es en promedio un 70 % de la extracción que le antecede, lo que permite aseverar que no son suficientes las dos extracciones sucesivas que indica el método AOAC debido al muy bajo coeficiente de reparto observado.

Este resultado podría asumirse también como el porcentaje en peso total de conservador que contiene la muestra tal como se asumió en el análisis de solubilización de los conservadores y representa al igual el doble del límite máximo de la NOM-122, lo que significa como se había mencionado una inadecuada cuantificación por dos factores que son: solubilización de los conservadores de la masa cárnica y coeficiente de reparto pequeño.

Sobre estos dos factores cabe hacer una pausa para indicar que el porcentaje en peso de conservador de la porción # 1 en el apartado 6.5, así como el de la extracción # 1 del apartado 6.6, corresponde al análisis por el método AOAC. Dado que en ambos apartados se emplearon las mismas muestras para dar seguimiento al contenido total de conservador, el valor se tomó como punto de referencia y se analizaron por separado, sin embargo el porcentaje en peso total de conservador en la muestra corresponde a la suma de los dos factores solubilización y extracciones sucesivas.

Agrupando ambos resultados en la tabla 10, se obtiene como se indicó el porcentaje en peso total de conservador en una muestra.

**Tabla 10. Porcentajes en peso de las extracciones realizadas a partir de las porciones empleadas para la solubilización de los conservadores y de la alícuota inicial**

Extracciones	% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K	% (p/ p) Total
1	0.045	0.034	0.079
1a	0.032	0.026	0.058
1b	0.022	0.017	0.039
1c	0.017	0.012	0.029
2	0.029	0.021	0.050
3	0.020	0.012	0.032
4	0.018	0.009	0.027
5	0.016	0.008	0.024
Total	0.199	0.139	0.338

Esta tabla indica que el porcentaje en peso de una muestra es 0.338 % por lo que el 0.079% en peso cuantificado, siguiendo el análisis del método AOAC es 4.3 veces menor. El valor de 0.338% en peso representaría por tanto estar fuera del límite máximo de la NOM-122 y ello conlleva a dar un resultado que es de importancia dentro del análisis de calidad de un producto, como pueden ser; enmascarar con un exceso de conservador malas prácticas de manufactura o bien para dar una vida más larga del producto en anaquel. Este valor puede representar también un peligro para el consumidor dado que representa un 338 % por encima del límite máximo. Además se observa que el porcentaje en peso de 0.199 % de NaBz y 0.139 % de Kso se encuentran fuera del límite máximo.

Se puede entonces mencionar que son dos factores los que afectan la recuperación de los conservadores:

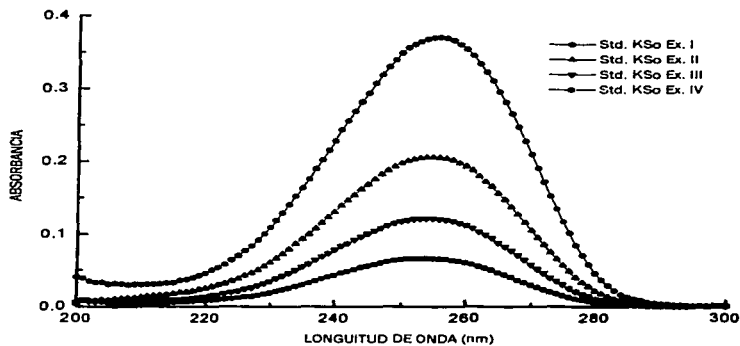
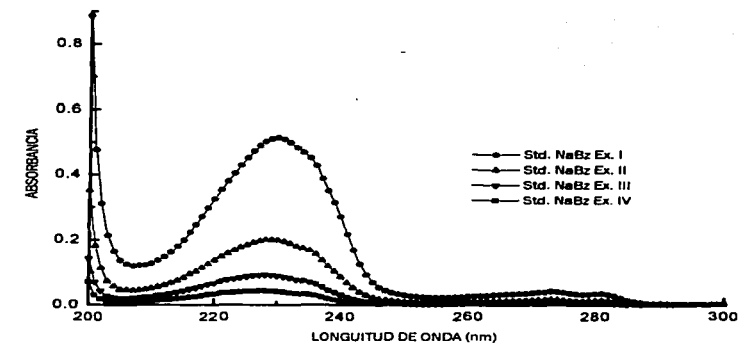
- I. Solubilización del analito que se encuentra en el producto cárnico en agua a temperatura ambiente.
- II. Capacidad del solvente orgánico, es decir coeficiente de reparto (D) muy bajo.

Los resultados anteriores hicieron suponer que, cuando se realiza el método para obtener las curvas de calibración, se presenta también una baja capacidad de extracción por el solvente, es decir, que de la alícuota inicial de 5 mL con estándares no se presenta una extracción cuantitativa y ello representa tener una respuesta de absorbancia para una concentración menor de la que se evalúa, por lo cual se diseñó el procedimiento mostrado en el diagrama # 13 (apéndice 9.1) .

#### **6.7. Incremento del número de extracción sucesivas "n" en los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio**

Con esta hipótesis planteada, se realizó el análisis de extracciones sucesivas de la alícuota inicial para los estándares de 6 mL de benzoato de sodio y sorbato de potasio con concentraciones de 83.3  $\mu\text{M}$  y 39.9  $\mu\text{M}$  respectivamente. De cada estándar se llevaron a cabo 6 extracciones más con porciones de 25 mL del solvente y se determinaron por espectrofotometría en volúmenes de 50 mL hasta observar la desaparición del conservador. En consecuencia se tienen las extracciones I, II, III y IV como se aprecia en la figura 6.





**Figura 6. Espectros electrónicos de absorción de los estándares (Std) de benzoato de sodio (NaBz) y sorbato de potasio (KSo) por extracciones sucesivas.**

La absorbancia de cada extracción se registró en la tabla 1.1. Si se considera que el total de las cuatro extracciones corresponde a la absorbancia real de los estándares en estudio, los valores de las extracciones I, II, III y IV corresponden al 100 % de cada conservador.

**Tabla 1.1. Absorbancia de las extracciones realizadas y porcentaje de extracción de los estándares de benzoato de sodio 83.3  $\mu$ M y sorbato de potasio 39.9  $\mu$ M**

Estándar de Benzoato de Sodio 83.27 $\mu$ M			Estándar de Sorbato de Potasio 39.94 $\mu$ M		
#Extracción	Absorbancia	% NaBz extraído	#Extracción	Absorbancia	% KSo extraído
I	0.510	60.50	I	0.368	48.36
II	0.200	23.72	II	0.206	27.07
III	0.091	10.79	III	0.121	15.90
IV	0.042	4.99	IV	0.066	8.67
Total	0.843	100	Total	0.761	100

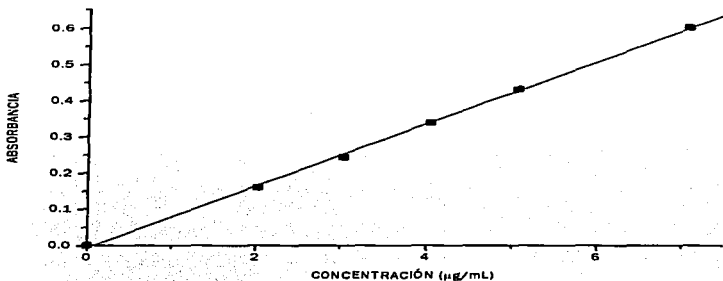
Partiendo de esta consideración la extracción I del estándar de benzoato de sodio con una absorbancia de 0.510 representa el 60.50 % de extracción, la extracción II es del 23.72 % las extracciones III y IV corresponden respectivamente, a un 10.79 % y 4.99 %. Los porcentajes de extracción del estándar de sorbato de potasio se presentan de la misma forma que los de benzoato de sodio y se observa que cada extracción adicional corresponde en promedio a un 50 % de la que le antecede en ambos estándares. Se puede mencionar también que hay una mayor extracción en el primer paso para benzoato de sodio con un 60.5 % que en el caso de sorbato de potasio con 48.36 %, esto puede indicar una menor solubilidad de este estándar en el solvente orgánico o a un aspecto que ya se había mencionado de interferencia espectral que el sorbato de potasio tiene sobre el benzoato de sodio, esa interferencia es aditiva para la absorción del benzoato de sodio.

Hasta ahora los análisis que se realizaron indican de antemano que la determinación poco cuantitativa obedece principalmente a una baja solubilidad de los estándares en el solvente orgánico y se propone como hipótesis que el coeficiente de reparto (D) es un valor muy bajo ya que esta constante representa la relación entre la concentración de soluto en fase orgánica y la concentración de soluto en fase acuosa, partiendo de este conocimiento se propuso calcular el valor de esta constante.

Para ello se retomaron los resultados de absorbancia obtenidos de los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio que se presentaron en la tabla 1.1, y a partir de ahí se puede conocer la concentración en ambas fases ya que se conoce la concentración de la cual se parte y puede calcularse con los valores de absorbancia la concentración que se extrae y por diferencia, la concentración en la fase acuosa.

Para poder conocer la concentración de las cuatro extracciones que se realizaron de los estándares de NaBz y KSo, fue necesario construir una curva de calibración de ácido benzoico (HBz) y ácido sórbico (HSO) y es que se sabe que la determinación que se realiza por espectrofotometría en el método AOAC corresponde a la forma ácida de los conservadores dado que el medio se acidifica para poder realizar la extracción con el solvente orgánico. La curva se realizó con los valores de

absorbancia obtenidos de la determinación por espectrofotometría de la disolución de los ácidos en éter de petróleo a diferentes concentraciones. La concentración se pudo conocer entonces por interpolación con las representaciones gráficas 1 y 2 que corresponden a ácido benzóico y ácido sórbico respectivamente.



Gráfica 1. Curva de calibración de ácido benzóico en éter de petróleo.

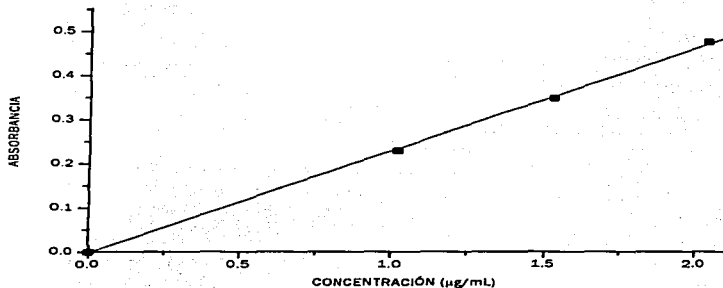
Datos de regresión lineal:  $y = mx + b$ .

Donde:  $m$  = pendiente  $b$  = ordenada al origen y  $r$  = coeficiente de correlación

$m = 0.08591$

$b = -0.00785$

$r = 0.99956$



Gráfica 2. Curva de calibración de ácido sórbico en éter de petróleo.

Datos de regresión lineal:  $m = 0.23201$   $b = -0.00308$   $r = 0.99973$

Las tablas 12a y 12b muestran la concentración calculada por interpolación de las curvas de calibración de cada una de las extracciones que se realizaron a los dos estándares en estudio en el análisis anterior.

Tabla 12a. Concentración de las extracciones realizadas del estándar de benzoato de sodio

Extracción	Absorbancia	Concentración ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
I	0.510	6.02
II	0.200	2.42
III	0.091	1.15
IV	0.042	0.58

Tabla 12b. Concentración de las extracciones realizadas del estándar de sorbato de potasio

Extracción	Absorbancia	Concentración ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
I	0.368	1.60
II	0.206	0.90
III	0.121	0.53
IV	0.066	0.30

## 6.8 Evaluación del coeficiente de reparto D

Una vez que se conocen los factores que impiden una recuperación cuantitativa de los conservadores y que se ha asumido de manera cualitativa que el coeficiente de reparto es un valor pequeño es necesario evaluar el valor numérico del coeficiente de reparto.

Para iniciar el cálculo de la constante D, se determinó la concentración real de los estándares en estudio: benzoato de sodio y sorbato de potasio a partir de las disoluciones realizadas de la solución patrón, esta concentración se cuantificó en la forma ácida ya que como se mencionó al inicio, ésta es la forma en que se determinan por espectrofotometría.

La solución patrón se preparó con 200 mg de benzoato de sodio en un volumen de 100 mL de agua, de ahí se tomó una alícuota de 6 mL y se aforó a 100 mL, por tanto la concentración en la forma ácida de la cual se inició la extracción es:

$$200\text{mgNaBz} * \left( \frac{1\text{mmol}}{144.11\text{mgNaBz}} \right) * \left( \frac{122.12\text{mgHBz}}{1\text{mmol}} \right) = 169.48\text{mgHBz}$$

$$\left( \frac{169.48\text{mgHBz}}{100\text{mL}} \right) * \left( \frac{6\text{mL}}{100\text{mL}} \right) = 0.10168 \text{ mg}'_{\text{mL}} = 101.68 \text{ } \mu\text{g}'_{\text{mL}} \text{ HBz}$$

y para ácido sórbico (HSo):

$$100\text{mgKSo} * \left( \frac{1\text{mmol}}{150.22\text{mgKSo}} \right) * \left( \frac{112.13\text{mgHSo}}{1\text{mmol}} \right) = 74.64\text{mgHSo}$$

$$\left( \frac{74.64\text{mgHSo}}{100\text{mL}} \right) * \left( \frac{6\text{mL}}{100\text{mL}} \right) = 0.045 \text{ mg}'_{\text{mL}} = 44.78 \text{ } \mu\text{g}'_{\text{mL}} \text{ HSo}$$

Al conocer la concentración de los estándares analizados y la concentración de cada extracción, es decir la de fase orgánica, entonces se puede conocer la

concentración que queda en fase acuosa por diferencia entre una y otra extracción y con ello calcular el coeficiente de reparto que se define por la siguiente ecuación:

$$D = \frac{(H_x)_{org}}{(H_x)_{ac.}}$$

El cálculo que a continuación se presenta se basa en el procedimiento de extracción del método oficial, considerando el volumen de alícuota a extraer de 5 mL y volumen final de extracción de 50 mL.

#### Cálculos para el coeficiente de reparto de ácido benzóico

Para conocer la masa total a extraer se multiplica la concentración real con la que se inició el análisis por el volumen de la alícuota que se tomó de 5 mL así entonces:

$$101.68 \text{ (}\mu\text{g/ mL) HBz} * 5 \text{ mL} = 508.40 \text{ }\mu\text{g HBz}$$

La concentración que se obtuvo al realizar la primera extracción se multiplica por el volumen final de 50 mL, para conocer la masa en fase orgánica entonces:

$$6.02 \text{ (}\mu\text{g/ mL) } * 50 \text{ mL} = 301 \text{ }\mu\text{g HBz}$$

Al conocer la concentración en fase orgánica por diferencia con la masa que debía extraerse se calculó la masa en fase acuosa:

$$508.40 \text{ }\mu\text{g} - 301 \text{ }\mu\text{g} = 207.40 \text{ }\mu\text{g HBz}$$

La concentración en fase acuosa es por tanto:

$$207.40 \text{ }\mu\text{g}/5 \text{ mL} = 41.48 \text{ }\mu\text{g/ mL HBz}$$

Si el coeficiente de reparto (D) es la relación entre la concentración de soluto en fase orgánica y la concentración de soluto en fase acuosa para la primera extracción se tiene que:

$$D_1 = 6.02 \text{ (}\mu\text{g/ mL)}/41.48 \text{ (}\mu\text{g/ mL) } = 0.15$$

Para la extracción II partimos de la masa que queda en fase acuosa:

$$m_{II} = 41.48 \text{ (}\mu\text{g/ mL)} * 5 \text{ mL} = 207.40 \text{ }\mu\text{g HBz}$$

La masa en fase orgánica de la extracción II resulta de la concentración que se determinó de esta extracción al multiplicarla por el volumen final de 50 mL por tanto:

$$2.42 (\mu\text{g}/\text{mL}) * 50 \text{ mL} = 121 \mu\text{g HBz}$$

La masa en fase acuosa por diferencia es:

$$207.4 \mu\text{g} - 121 \mu\text{g} = 86.40 \mu\text{g HBz}$$

La concentración en fase acuosa es :

$$86.40 \mu\text{g}/5 \text{ mL} = 17.28 \mu\text{g}/\text{mL HBz}$$

El coeficiente de reparto para la extracción I resulta:

$$D_{II} = 2.42 (\mu\text{g}/\text{mL}) / 17.28 (\mu\text{g}/\text{mL}) = 0.14$$

Así de cada extracción se calculó la constante D obteniendo los valores que se presentan en la tabla 13.

**Tabla 13. Coeficiente de reparto del estándar de benzoato de sodio**

Extracción	Coefficiente de reparto (D)
I	0.15
II	0.14
III	0.2
Promedio	0.16

De la tabla 13 se hace la anotación que para la extracción IV, no fue posible calcular la concentración en fase acuosa dado que el analito había pasado en su totalidad a la fase orgánica, esto se observó cuando se calculó la masa en fase orgánica y se obtuvo que era la misma masa que había quedado en fase acuosa.

#### Cálculos para el coeficiente de reparto de ácido sórbico

El cálculo para la constante de ácido sórbico se efectuó bajo el mismo procedimiento que se determinó la constante de ácido benzóico.

Así de cada extracción del estándar de sorbato de potasio se calculó la constante D obteniendo los valores que se presentan en la tabla 14.

**Tabla 14. Coeficiente de reparto del estándar de sorbato de potasio**

Extracción	Coefficiente de reparto (D)
I	0.06
II	0.05
III	0.04
IV	0.03
Promedio	0.05

En los valores determinados de D de los dos estándares se aprecia que el valor no es una constante cuando debería serlo y es que el error en la medición se da por la poca confiabilidad que presenta el método y a la adición de etanol, como se mencionó en su momento.

Considerando un valor promedio de los coeficientes de reparto experimentales determinados para los dos conservadores se observa que este adquiere valores por debajo de la unidad como muestra la tabla 15.

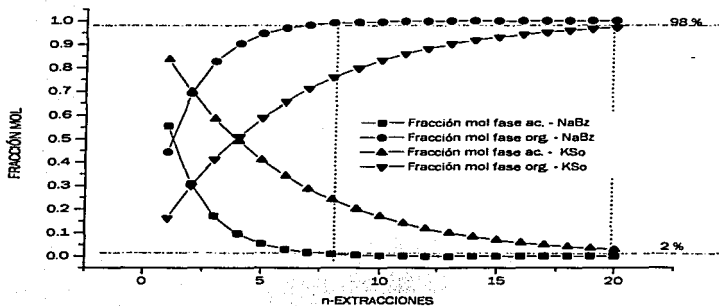
**Tabla 15. Coeficientes de reparto experimentales**

Coeficiente de Reparto (D)	
Benzoato de Sodio	Sorbato de Potasio
0.16	0.05

Estos valores indican una distribución mínima del soluto en fase orgánica y como se observó, la del sorbato de potasio es demasiado pequeña, esto explica porque la recuperación de la alícuota inicial fue mayor para benzoato de sodio. Además es posible visualizarlo con la gráfica 3 que muestra la fracción mol que se recupera en fase orgánica y acuosa en función del coeficiente de reparto experimental y permite ver que una recuperación cuantitativa se tendría con extracciones sucesivas, que para el caso de benzoato de sodio serían 8 y para el sorbato de potasio 20.

Esto corrobora que no son suficientes las dos extracciones que indica el método AOAC debido a que los coeficiente de reparto de los analitos en estudio presentan valores muy bajos.

Cabe hacer notar que las lecturas de absorbancia para las muestras se realizaron a 225 nm para ácido benzoico y 250 nm para ácido sórbico de acuerdo con lo que indica el método, sin embargo la longitud de onda de máxima absorción es en 228 nm para ácido benzoico y 253 nm para ácido sórbico de acuerdo con el espectro de absorción electrónico obtenido de los ácidos en éter de petróleo, por lo que se puede indicar que la lectura de absorbancia no se lleva a cabo de forma adecuada y es un factor más que repercute en la cuantificación, es decir que el porcentaje en peso reportado debería ser mayor al estimado.



Gráfica 3. Fracción mol, en fase acuosa y fase orgánica para benzoato de sodio (NaBz) y sorbato de potasio (KSo) en función del coeficiente de reparto experimental (D)

En resumen se puede decir que el análisis para la determinación de conservadores por el método AOAC presenta varios inconvenientes que repercuten en obtener una cuantificación del 98% y por lo cual se podría hablar de un método poco confiable.

Uno de los factores que involucra esta aseveración es el valor numérico tan bajo del coeficiente de reparto y que en consecuencia hace que la extracción del analito sea incompleta. Este factor podría mejorarse haciendo un cambio de disolvente orgánico, en el cual los conservadores presenten mayor solubilidad.

El segundo factor se debe a la escasa solubilización del analito del producto cárnico, lo cual implica modificar las condiciones de extracción como pueden ser; volumen de disolvente, tiempo o forma de extracción como pudiera ser la agitación y temperatura.

Un tercer factor que está relacionado en forma indirecta y que es de consideración en la forma de cuantificación, es la interferencia espectral que el sorbato de potasio presenta sobre el benzoato de sodio y lo cual deriva como se había mencionado en cuantificar un porcentaje en peso extra de benzoato de sodio, cuando en realidad no lo hay, este problema puede ser abordado por un método basado en mediciones a dos longitudes de onda (determinación espectrofotométrica simultánea) este método permite restar la absorción adquirida por el compuesto que hace la interferencia asegurando que la cuantificación solo corresponde a la presencia del conservador en estudio.



Otros factores adicionales son no realizar las lecturas de absorbancia en las longitudes de máxima absorción de los compuestos y la adición de etanol como anti-emulsionante.

Por tanto los inconvenientes que presenta el método AOAC y que derivan en una extracción poco cuantitativa y en una cuantificación errónea, hacen un método poco confiable y ello conlleva a la optimización del método AOAC bajo un esquema que incremente los valores de los factores involucrados y en consecuencia la cuantitatividad de los conservadores.

## 6.9. Optimización del método AOAC

### 6.9. 1. Elección del solvente orgánico

Una de las variables de la cual depende la distribución del analito a la fase cuantificable es el solvente orgánico, su elección para la propuesta de modificación se baso por su uso frecuente en técnicas de extracción de compuestos orgánicos, considerando como parámetro para ser utilizados como disolventes el no presentar interferencia espectral en el intervalo de longitud de onda de 200 nm a 300 nm.

De los tres disolventes orgánicos seleccionados dos de ellos; acetato de etilo y cloroformo presentan fuertes absorciones en la región de 200 nm a 250 nm que ocultan las absorciones de las especies de interés como muestra la figura 7. El tercer disolvente; éter etílico no presenta absorciones en el intervalo de estudio, como se aprecia en la misma figura y puede ser utilizado como disolvente en la determinación de conservadores.

Una vez elegido el solvente, el primer paso para la nueva propuesta de análisis fue la selección de la longitud de onda en la cual los conservadores en estudio presentarán la máxima absorción. En la longitud de onda seleccionada se realizaron las determinaciones espectrofotométricas de las muestras analizadas y esto se pudo especificar a partir de la disolución de los ácidos en éter etílico a distintas concentraciones. La longitud de onda a la cual se presentó la máxima absorción para ácido benzoico fue en  $\lambda_{m\acute{a}x.} = 226 \text{ nm}$  y  $\lambda_{m\acute{a}x.} = 251 \text{ nm}$  para ácido sórbico.

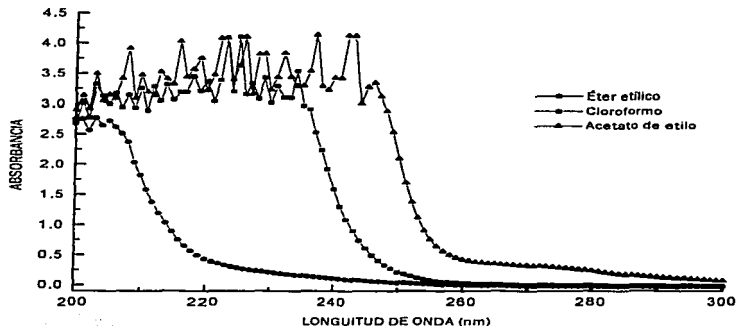


Figura 7. Espectro electrónico de absorción de los solventes seleccionados para la optimización del método AOAC. Condiciones: Celda de cuarzo ajustado con blanco de aire.

### 6.9.2. Curvas de calibración

Con la elección del solvente orgánico, el análisis para la optimización del método AOAC prosiguió con la construcción de las curvas de calibración de los analitos en estudio con éter etílico, este procedimiento se realizó siguiendo el esquema que propone el método AOAC tal como se muestra en el diagrama 15 (apéndice 9.1).

Al efectuar estas mediciones químicas es común el caso de una respuesta lineal entre la variable de medición (absorbancia) y la concentración del analito. Dicha respuesta se expresa comúnmente por la ecuación de una recta:

$$y = m \cdot x + b$$

donde llamamos pendiente a la constante  $m$  y ordenada al origen  $b$ .

El problema al hacer mediciones químicas es que se tiene incertidumbre tanto en la variable medida, como en la concentración, para resolverlo normalmente se considera que el error en la concentración es mucho menor que el error en la señal medida, algo que no siempre es válido, pero que resulta difícil negar a priori, de ahí que las curvas de calibración de las técnicas de medición se expresen comúnmente por la recta, sin embargo el análisis estadístico debe consistir en encontrar la mejor recta posible que pase por los puntos experimentales, pero minimizando los errores de la variable dependiente.

El error de cada medida se calcula como la distancia sobre las  $y$  entre el valor observado y el valor de la recta:

$$e = (y_i - (m \cdot x_i + b))$$

Del mismo modo que con la varianza, se calcula el error cuadrático total como la suma de los cuadrados de las diferencias:

$$e_t^2 = \sum_{i=1}^n [y_i - (m \cdot x_i + b)]^2$$

Finalmente, para encontrar la mejor recta, se calculan los valores de  $m$  y  $b$  dando un mínimo en el error cuadrático. Esto se hace derivando la ecuación anterior e igualando a cero esta derivada. El resultado es un sistema de dos ecuaciones muy conocido:

$$\begin{aligned} \sum y_i &= m \cdot \sum x_i + n \cdot b \\ \sum x_i y_i &= m \cdot \sum x_i^2 + b \cdot \sum x_i \end{aligned}$$

Por lo tanto, los estimadores de la ordenada y pendiente están dadas por:

$$\begin{aligned} m &= \frac{n(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \\ b &= \frac{(\sum x_i^2)(\sum y_i) - (\sum x_i)(\sum x_i y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \end{aligned}$$

de donde  $y_i$  es la absorbancia y  $x_i$  la concentración de los estándares.

Con la finalidad de tener un respaldo estadístico de la nueva propuesta de análisis, se realizaron siete curvas de calibración con su respectivo análisis estadístico de regresión lineal. La tabla 16a muestra los resultados de las siete curvas de calibración para benzoato de sodio y en la tabla 16b se agrupan los promedios de cada concentración con su desviación estándar e intervalo de confianza. En la tabla 17a y 17b se presentan los resultados del estándar de sorbato de potasio de la misma forma que para benzoato.

**Tabla 16a. Resultados de la determinación espectrofotométrica para la construcción de la curva de benzoato de sodio**

$\mu\text{mol/L}$	A	B	C	D	E	F	G
O	O	O	O	O	O	O	O
13.88	0.0715	0.0903	0.0895	0.0801	0.1935	0.1129	0.0988
27.76	0.2448	0.2794	0.2864	0.2281	0.3657	0.2421	0.2233
41.63	0.3891	0.4522	0.456	0.3791	0.5239	0.4229	0.3935
55.51	0.5538	0.5999	0.6148	0.5497	0.6734	0.5742	0.5644
69.39	0.6974	0.7748	0.7614	0.6788	0.8378	0.7405	0.7374
83.27		0.9231	0.8969	0.8538	1.0008	0.8586	0.8872
<b>Análisis de regresión lineal no ponderada r (coeficiente de correlación), m (pendiente), b (ordenada al origen)</b>							
r	0.99588	0.99816	0.99859	0.99696	0.99937	0.99309	0.99661
m	0.0105	0.0115	0.0119	0.0105	0.0113	0.0108	0.0110
b	-0.037	-0.032	-0.03	-0.042	0.021	-0.025	-0.044

**Tabla 16b. Regresión lineal, desviación estándar o intervalo de confianza de los resultados promedio de las concentraciones de benzoato de sodio**

$\mu\text{mol/L}$	Promedio Absorbancia	Desviación Estándar	Intervalo Confianza
O	O	O	O
13.88	0.105	0.0411	0.038
27.76	0.267	0.0497	0.046
41.63	0.431	0.0510	0.047
55.51	0.590	0.0438	0.041
69.39	0.747	0.0524	0.048
83.27	0.903	0.0541	0.050
<b>Datos del análisis de regresión lineal</b>			
r	0.99889		
m	0.01111		
b	-0.028		

**Tabla 17a. Resultados de la determinación espectrofotométrica para la construcción de la curva de sorbato de potasio**

$\mu\text{mol/L}$	A	B	C	D	E	F	G
O	O	O	O	O	O	O	O
6.66	0.158	0.1508	0.166	0.1597	0.2175	0.1428	0.1207
13.31	0.328	0.3474	0.3495	0.342	0.3979	0.3393	0.3432
19.97	0.5044	0.5184	0.5175	0.519	0.5881	0.5178	0.5038
26.63	0.6847	0.7065	0.7091	0.7155	0.7576	0.6679	0.6853
33.28	0.8962	0.8897	0.9074	0.895	0.9388	0.8893	0.8379
39.94	1.0683	1.0779	1.0788	1.0827	1.0764	1.0355	1.0303
<b>Análisis de regresión lineal no ponderada r (coeficiente de correlación), m (pendiente), b (ordenada al origen)</b>							
r	0.99925	0.99967	0.99970	0.99969	0.99858	0.99904	0.99881
m	0.0270	0.0272	0.0272	0.0273	0.0270	0.0264	0.0261
b	-0.012	-0.016	-0.011	-0.012	0.029	-0.015	-0.0185

**Tabla 17b. Regresión lineal, desviación estándar e intervalo de confianza de los resultados promedio de las concentraciones de sorbato de potasio**

$\mu\text{mol /L}$	Promedio Absorbancia	Desviación Estándar	Intervalo Confianza
0	0	0	0
6.66	0.159	0.0296	0.027
13.31	0.350	0.0224	0.021
19.97	0.524	0.0290	0.027
26.63	0.704	0.0290	0.027
33.28	0.893	0.0299	0.028
39.94	1.064	0.0219	0.020
Datos del análisis de regresión lineal			
r	0.9998		
m	0.028		
b	- 0.0169		

Como consecuencia de la incertidumbre en las mediciones de las variables, el uso de la recta para predicciones, tendrá necesariamente cierta incertidumbre que es necesario evaluar. Para ello se hace uso del intervalo de confianza sobre los valores de calibración; que se conoce comúnmente como cinturón de confianza y se usa cuando se desea saber si un punto de calibración está fuera de la recta y se puede rechazar como valor aberrante. Se calcula con la ecuación:

$$y_{\text{stdr}} = (m \cdot x_{\text{stdr}} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot S \cdot \sigma \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_{\text{stdr}} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

Si un punto de la curva de calibración queda fuera del cinturón de confianza, se puede rechazar con un riesgo  $\alpha$ .

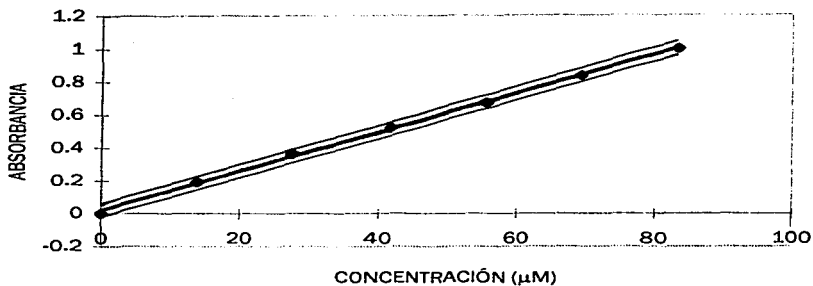
Límites de predicción de una regresión lineal: cuando se hace uso de la curva de calibración para medir muestras, el intervalo de predicción es mayor al cinturón de confianza de los valores de calibración, se le llama cinturón de predicción y esta dado por la ecuación:

$$y_{\text{mtra}} = (m \cdot x_{\text{mtra}} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot S \cdot \sigma \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_{\text{mtra}} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

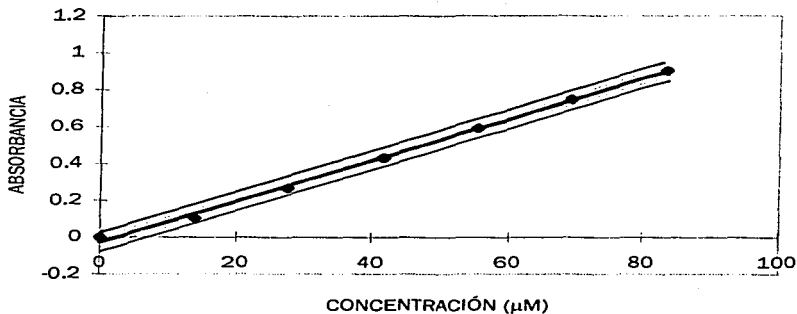
Este intervalo de predicción, se utiliza mucho, ya que permite estimar la incertidumbre de las mediciones de problemas que se realizan.

Los cinturones de confianza y predicción se muestran para las curvas de calibración realizadas para benzoato de sodio y sorbato de potasio, con la finalidad de avalar la optimización del método AOAC, de las gráficas mostradas a continuación se observa que los puntos de la regresión lineal se encuentran dentro del cinturón de confianza y predicción respaldando la nueva propuesta planteada.

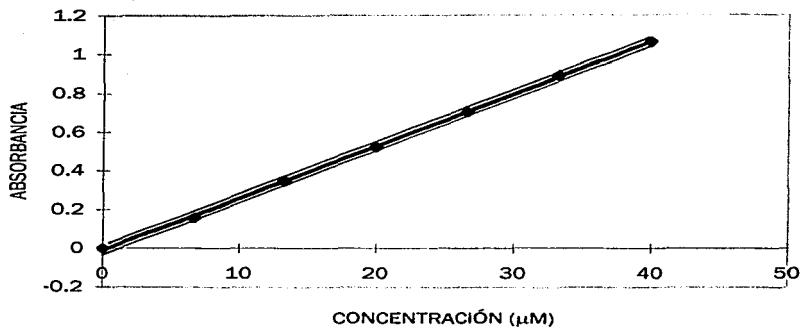
CINTURONES DE CONFIANZA (---) Y PREDICCIÓN (—) PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN (E) DE BENZOATO DE SODIO



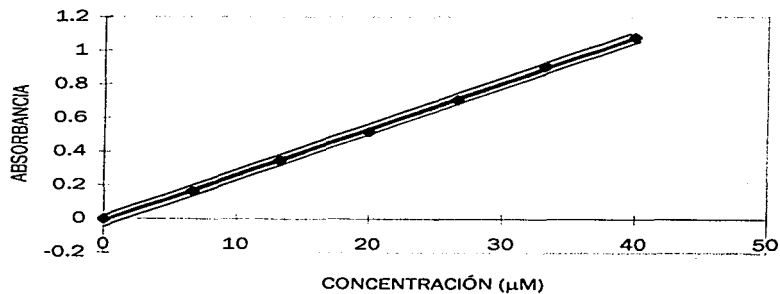
CINTURONES DE CONFIANZA (---) Y PREDICCIÓN (—) PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN PROMEDIO DE BENZOATO DE SODIO



CINTURONES DE CONFIANZA (- - -) Y PREDICIÓN (—) PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN (C) DE SORBATO DE POTASIO



CINTURONES DE CONFIANZA (- - -) Y PREDICIONES (—) PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN PROMEDIO DE SORBATO DE POTASIO



### 6.9.3. Límite de detección

Los métodos instrumentales de análisis son capaces de detectar y determinar cantidades de analito muy pequeñas, por lo cual los métodos estadísticos son importantes para la evaluación de la concentración mínima que asegura que lo que se cuantifica es muestra y se conoce como límite de detección. El límite de detección fue calculado como la concentración que proporciona una señal igual a la del blanco ( $y_B$ ) más tres veces la desviación estándar del blanco ( $S_B$ );  $y_i - y_B = 3S_B$ . La tabla 19 presenta los valores a partir de los cuales fueron calculados los límites de detección,  $S_B$  es proporcional a  $S_x/y = (\sum(y_i - \bar{y})^2/n)^{0.5}$  de donde  $y$  es el valor experimental de absorbancia correspondiente a cada concentración,  $\bar{y}$  el valor recalculado a partir de la curva de regresión lineal de ahí que  $y_i = y_B + 3S_B$ .

**Tabla 19. Desviación estándar del blanco (Sy/x) y valores de absorbancia (y<sub>i</sub>) a la que se tiene una respuesta de concentración mínima cuantificable para benzoato de sodio (a) y sorbato de potasio (b)**

$\mu\text{mol/L}$	$Sy/x$	$y_i$	$\mu\text{mol/L}$	$Sy/x$	$y_i$
0	0.02762	0.04623	0	0.01650	0.02963
13.88	0.02290	0.03663	6.66	0.01097	0.01685
27.76	0.02452	0.04968	13.31	0.01054	0.02006
41.63	0.02696	0.03934	19.97	0.01008	0.01517
55.51	0.01376	0.06214	26.63	0.02272	0.09710
69.39	0.02118	0.03908	33.28	0.01823	0.03989
83.27	0.02986	0.04594	39.94	0.02006	0.04169

(a)

(b)

Por lo tanto el límite de detección esta dado por  $LDD = (y_i - y_B)/A$ ; en esta ecuación  $y_B$  es la ordenada al origen y  $A$  la pendiente.

El análisis estadístico muestra en la tabla 20 los promedios de los límites de detección calculados a partir de las siete curvas realizadas y de la cual los límites de detección son: 6.53  $\mu\text{M}$  en ácido benzoico y 1.74  $\mu\text{M}$  para ácido sórbico, es decir la concentración mínima que se puede asumir a la muestra, esto implica que a cada concentración determinada deberá de suponerse de antemano que el límite de detección esta siendo aditivo y en un sentido estricto no corresponde al analito en estudio. Un ejemplo con el cual queda claro esta aseveración es el siguiente; al cuantificar 0.1 % en peso de conservador en muestra, es decir cuando la concentración de benzoato de sodio es 69.39  $\mu\text{M}$  y la concentración de sorbato de potasio es 66.5  $\mu\text{M}$ , se tiene que al considerar la concentración mínima de analito en muestra, es decir de acuerdo con sus respectivos límites de detección se cuantifica un porcentaje extra del:

$$(6.53 \mu\text{M}/69.39 \mu\text{M}) * 100 = 9.41 \% \text{ extra de benzoato de sodio y}$$

$$(1.74 \mu\text{M}/66.5 \mu\text{M}) * 100 = 2.5 \% \text{ extra de sorbato de potasio}$$

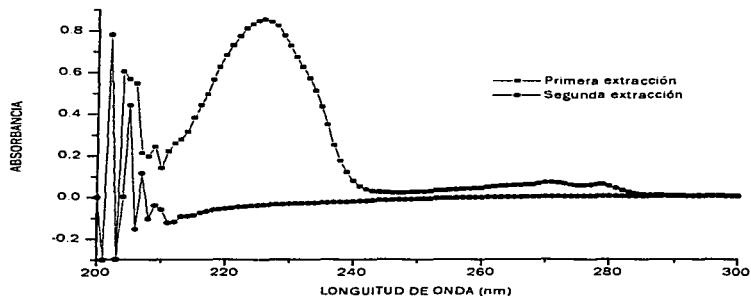


**Tabla 20. Límites de detección**

Curva	Benzoato ( $\mu\text{M}$ )	Sorbato ( $\mu\text{M}$ )
A	7.93	1.83
B	5.99	1.21
C	6.55	1.16
D	7.70	1.11
E	3.49	2.53
F	5.93	2.07
G	8.13	2.30
Promedio	6.53	1.74

#### 6.9.4. Incremento del número de extracciones sucesivas "n" en los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio con éter etílico en la etapa 4

La capacidad de extracción del éter etílico respecto a la del éter de petróleo, fue un parámetro para determinar si la elección del éter etílico como solvente orgánico es mejor que el éter de petróleo, para ello se realizó una segunda extracción de la alícuota inicial en los estándares utilizados para la construcción de la curva de calibración, bajo el mismo procedimiento de cuando se empleó éter de petróleo como disolvente, es decir se obtuvo una extracción más de la que indica el método AOAC en los estándares de 6 mL, que presentan una concentración de  $83.3 \mu\text{M}$  para benzoato de sodio y  $39.9 \mu\text{M}$  en sorbato de potasio y las figuras 10 y 11 muestran que la segunda extracción en ambos estándares no presenta respuesta de absorción electrónica, lo cual indica una capacidad excelente del éter etílico para la extracción de los conservadores.



**Figura 10. Espectros electrónicos de absorción después de realizar 2 extracciones con éter etílico en el estándar de NaBz de concentración  $83.3 \mu\text{M}$**

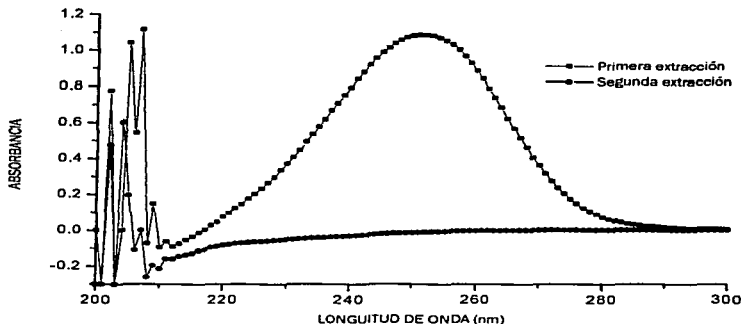


Figura 11. Espectros electrónicos de absorción después de realizar 2 extracciones con éter etílico en el estándar de KSo de concentración 39.9  $\mu\text{M}$

Se observa entonces que el efecto que tiene el éter etílico en el análisis como solvente es mejor, ya que mientras que con el éter de petróleo se requerían por lo menos cuatro extracciones para tener una extracción del 98%, con el éter etílico una extracción es suficiente para tener una extracción cuantitativa de esa magnitud.

#### 6.9.5. Análisis de una muestra de producto cárnico

El análisis de la muestra se realizó bajo el esquema de trabajo del método AOAC, dicho el procedimiento comprende la adición de una porción de agua al producto cárnico y dejar en reposo por 10 minutos con la finalidad de extraer los conservadores, después se toma una alícuota que se acidifica con ácido clorhídrico (HCl) hasta  $\text{pH} = 1$ , se realiza la extracción de los conservadores en su forma ácida con el solvente orgánico y se determina por espectrofotometría. El análisis de la muestra con éter etílico se realizó de manera general con el esquema anterior salvo que la disolución de los conservadores del producto cárnico, se llevó a cabo con un peso de muestra de 10 g y con agitación magnética por 10 minutos con un reposo posterior del mismo tiempo, con el fin de optimizar el método AOAC, una vez que se tenía el antecedente de la baja solubilización de los conservadores de la masa cárnica en agua, esta modificación es sin embargo solo un análisis preliminar que será abordado más adelante.

El análisis expuesto en el párrafo anterior se realizó con cinco muestras de carne y los resultados que se muestran en la tabla 21 corresponden a los porcentajes en peso de conservador cuantificados.

**Tabla 21. Porcentaje en peso de NaBz y KSo por el método AOAC con éter etílico**

Muestra	% (p/p) Benzoato Na	% (p/p) Sorbato K	% (p/p) Total
1	0.073	0.041	0.114
2	0.063	0.041	0.104
3	0.064	0.039	0.103
4	0.070	0.047	0.117
5	0.075	0.047	0.122
Promedio	0.069	0.043	0.112
Intervalo de confianza	0.006	0.005	0.010

De la tabla anterior se tiene que el promedio de porcentaje en peso total fué de 0.112 %  $\pm$  0.010 % y el intervalo de confianza es un 9 % de ese valor, esta diferencia en la determinación puede obedecer al error que por si solo maneja el método, es decir, el límite de detección y por tanto permite dar confiabilidad al análisis realizado bajo estas condiciones.

De las dos condiciones modificadas en el mismo análisis; agitación magnética y solvente orgánico, se observó que la primera permitió mejorar la solubilización del conservador del producto cárnico y con la segunda la extracción fue cuantitativa.

#### **6.9.6. Incremento del número de extracciones sucesivas "n" en una muestra de producto cárnico en la etapa 4 con éter etílico**

Las modificaciones planteadas para la optimización del método AOAC han sido hasta ahora favorables sin embargo aún corresponde hacer un análisis en muestra al igual que se hizo en los estándares, con la finalidad de confirmar que el éter etílico permite una extracción cuantitativa de al menos 98% con una sola extracción y para ello se realizó una extracción adicional en la etapa 4 que corresponde a la extracción con el solvente orgánico. Para ello de las muestras que se analizaron en el procedimiento anterior se realizó la extracción adicional que se menciona.

La figura 12 muestra el espectro electrónico de absorción de una de las muestras analizadas y de este se puede observar que en la extracción adicional que se efectuó no hay absorbancia en las longitudes de onda de máxima absorción de los analitos en estudio, es decir la primera extracción se lleva cabo de forma cuantitativa y esto permitió sugerir que el coeficiente de reparto (D) es considerablemente mayor que en el caso del éter de petróleo.

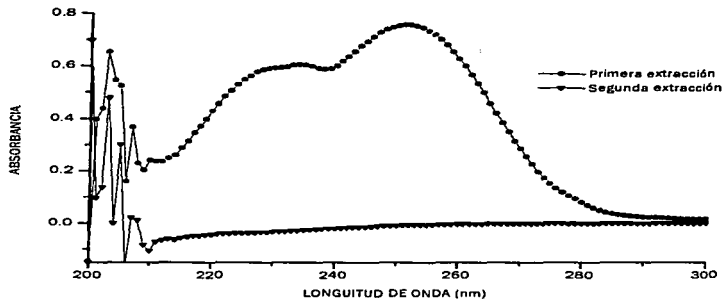


Fig.12. Espectro electrónico de absorción de una muestra problema con una y dos extracciones de la misma alícuota

#### 6.9.7. Coeficiente de reparto para éter etílico

Se ha mencionado que el coeficiente de reparto es un valor más alto con el solvente de éter etílico, dado los resultados que se han obtenido, por lo cual el cálculo de esta constante fue necesario, con la finalidad de dar respaldo a estas aseveraciones.

El coeficiente de reparto experimental para éter etílico se determinó entonces a partir de los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio empleando las concentraciones bajo las cuales se realizaron las curvas de calibración, para ello fue necesario conocer la concentración de soluto en fase acuosa y la concentración de soluto en fase orgánica, siempre que el soluto se encuentre bajo la misma forma en ambas fases, es decir la ácida y de ahí que el valor de D fue fácil de calcular con la siguiente fórmula:

$$D = [S_{org} * (V_{ac}/V_{org})]/S_{ac}.$$

donde  $S_{org}$  y  $S_{ac}$  son las concentraciones en fase orgánica y fase acuosa respectivamente,  $V_{ac}$  es el volumen de la fase acuosa y  $V_{org}$  el volumen de fase orgánica.

La forma ácida de los conservadores en fase acuosa se consiguió como se sabe porque esta se acidifica hasta pH = 1 y pasan al solvente orgánico en la misma forma, el residuo de fase acuosa permanece en medio ácido, por tanto la fracción que quede de soluto estará en esas condiciones y para ser cuantificada se construyó una curva

de calibración con los estándares de benzoato de sodio y sorbato de potasio en medio acuoso a pH =1.

Los espectros electrónicos de absorción de los residuos de fase acuosa se muestran en las figuras 13 y 14 para ácido benzóico y ácido sórbico respectivamente, de estos podemos observar que la interferencia espectral que se ha venido mencionando es clara en estos espectros cuando prácticamente la porción de analito es cero.

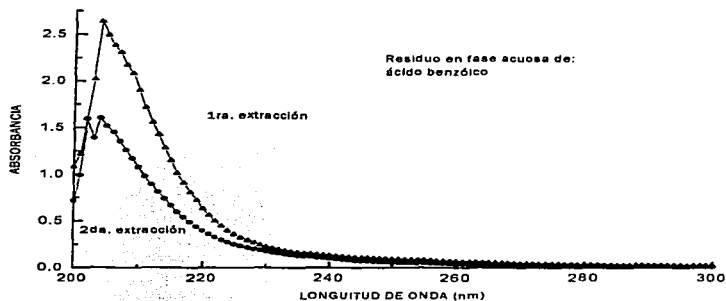


Figura 13. Espectros electrónicos de absorción de los residuos en fase acuosa de ácido benzóico después de realizar la primera y segunda extracción de una concentración 882.6  $\mu\text{M}$

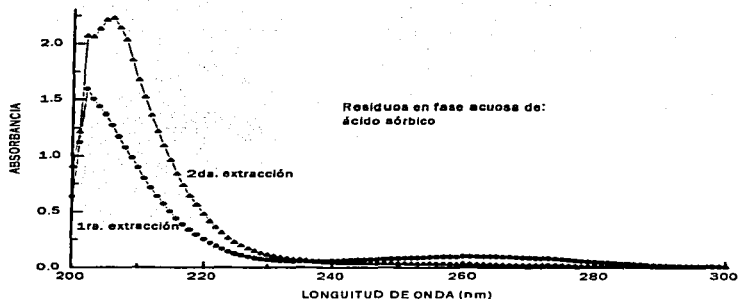
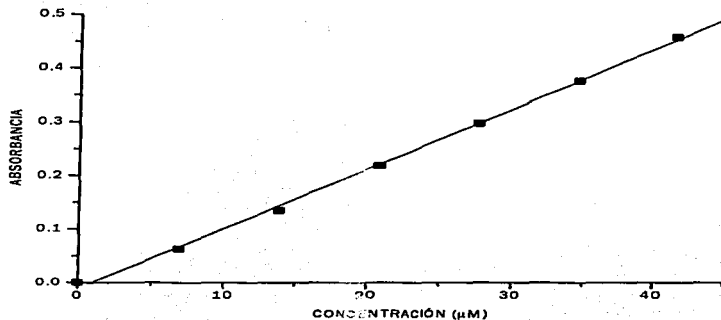


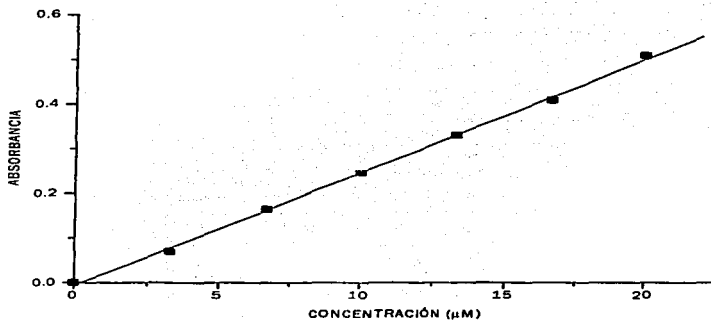
Figura 14. Espectros de absorción de los residuos en fase acuosa de ácido sórbico después de realizar la primera y segunda extracción de una concentración 399.4  $\mu\text{M}$

De esos espectros se tomó la lectura de absorbancia en las longitudes de onda de máxima absorción de los dos conservadores en estudio y se cuantificó la concentración que correspondería a la de la fase acuosa por interpolación con las curvas de calibración de los estándares en medio acuoso ácido que se realizaron con el siguiente procedimiento: de las soluciones patrón que se encuentran en agua se tomaron diluciones y de cada concentración se separó una alícuota, se acidificaron con ácido clorhídrico (HCl) hasta  $\text{pH} = 1$  y se realizó la determinación espectrofotométrica, los espectros de absorción fueron obtenidos, empleando como blanco agua más la misma cantidad de ácido empleada en muestras.

Bajo este procedimiento se construyeron las curvas de calibración que se presentan en las gráficas 4 y 5, y se calcularon las concentraciones en fase acuosa que se presentan en las tablas 22a y 22b para ácido benzoico y ácido sórbico respectivamente. Las concentraciones de la fase orgánica fueron calculadas por diferencia entre la concentración inicial menos la concentración en fase acuosa y se presentan en la misma tabla.



Gráfica 4. Curva de calibración de ácido benzoico en medio acuoso.  
 Datos de regresión lineal;  $r = 0.9993$ ,  $m = 0.0111$  y  $b = -0.0107$



Gráfica 5. Curva de calibración de ácido sórbico en medio acuoso.  
 Datos de regresión lineal;  $r = 0.9994$ ,  $m = 0.0254$  y  $b = -0.0068$

**Tabla 22. Concentraciones en fase orgánica y fase acuosa de ácido benzoico (a) y ácido sórbico (b), para la determinación del coeficiente de reparto en éter etílico**

Concentración de ácido benzoico			Concentración de ácido sórbico		
Inicial	Fase acuosa	Fase orgánica	Inicial	Fase acuosa	Fase orgánica
µM	µM	µM	µM	µM	µM
138.8	5.877	132.92	66.6	1.333	65.27
277.6	9.463	268.14	133.2	0.824	132.38
416.4	11.868	404.53	199.8	1.238	198.56
555.2	7.400	547.8	266.2	0.966	265.23
694.0	11.877	682.12	332.8	1.084	331.72
832.6	13.076	819.52	399.4	1.273	398.13

(a)

(b)

Con estos datos se calculó el coeficiente de reparto (D) con la fórmula presentada y en la tabla 23 se presentan los valores de D obtenidos para cada concentración de ambos conservadores. De estos resultados se observó que D no es un valor constante, aún cuando se sabe que es independiente de la concentración este valor solo comienza a ser constante a concentraciones altas, la justificación de no tener un constante independientemente de la concentración, se da por dos aspectos uno es el límite de detección y es que se observó que las concentraciones en fase acuosa son muy bajas y están muy cerca del valor de límite de detección que fue de 6.53 y 1.74 para benzoico y sórbico respectivamente, esto permite dudar de la concentración determinada y el otro aspecto es no contar con un blanco adecuado que elimine la interferencia señalada con anterioridad del éter etílico e implica un desplazamiento en los espectros de absorción de los analitos, afectando a los de concentraciones más bajas. Si consideramos que el desplazamiento debido al error del blanco es  $C_b = 1$ , y que una cuantificación  $C_x$  tiene un valor de 10 tendremos el porcentaje de error estará dado por;

$$\% \text{error} = [(C_x - C_b) / C_x] * 100$$

con la ecuación anterior se tiene entonces un % error = 0.1, si la concentración calculada  $C_x$  es ahora de 20, el error disminuye a la mitad es decir a un 0.05 %, se hace notar por tanto que a concentraciones altas el error debido a un blanco no adecuado será despreciable y no será así para las concentraciones más bajas. Tomando esta consideración el coeficiente de reparto para ácido benzoico es 3.28 y para ácido sórbico 29.77, al considerar solo los datos de las tres últimas concentraciones (las más altas), en donde el error del blanco deja de ser considerable.

**Tabla 23. Coeficiente de reparto (D) para ácido benzoico y sórbico en éter etílico**

Acido benzoico	Acido sórbico
D	D
0.79	4.90
1.35	16.06
1.83	16.04
3.15	27.45
3.12	30.59
3.56	31.26
$\bar{D} = 3.28$	$\bar{D} = 29.77$

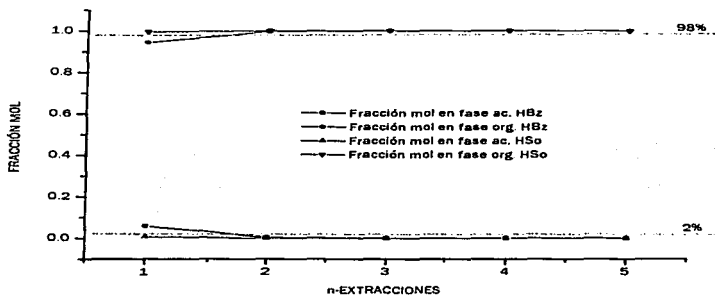


Un resultado más que se obtuvo de las concentraciones de fase acuosa y orgánica fue el porcentaje de extracción, calculado tomando la relación entre la concentración de fase acuosa y la concentración inicial. Siendo en promedio ( $\bar{E}$ ) el 94.63 % para ácido benzoico y 99.29 % en ácido sórbico como se muestra en la tabla 24.

Tabla 24. Porcentaje de extracción

Ácido benzoico	Ácido sórbico
% Extracción	% Extracción
88.78	97.99
93.10	99.38
94.82	99.38
96.92	99.64
96.89	99.67
97.26	99.68
% $\bar{E}$ = 94.63	% $\bar{E}$ = 99.29

Este resultado se aprecia en la gráfica 6 que se realizó en función del coeficiente de reparto experimental de éter etílico y se observa que la fracción mol en fase orgánica es cuantitativa hasta en un 98% con las extracciones recomendadas en el método AOAC.



Gráfica 6. Fracción mol, en fase acuosa y fase orgánica para ácido benzoico y sórbico en función del coeficiente de reparto experimental (D) de éter etílico

Los valores obtenidos de coeficiente de reparto en éter etílico fueron 3.28 en benzoato y 29.77 para sorbato, mientras que en éter de petróleo fueron 0.16 para benzoato y 0.05 en sorbato, estos valores son en comparación con los de éter etílico

muy bajos y justifican el cambio de solvente orgánico, que permite una extracción cuantitativa optimizando el método AOAC.

#### 6.9.8. Solubilización de conservadores contenidos en la masa cárnica (etapa 1)

Una vez que se determinó que el éter etílico es mejor solvente para realizar el análisis de conservadores que el éter de petróleo, solo hizo falta considerar la solubilización de los conservadores del producto cárnico para optimizar el método propuesto tal como se consideró cuando se realizó la solubilización con agitación magnética.

Para poder evaluar si este cambio en el procedimiento fue favorable se realizaron tres solubilizaciones extras de la masa cárnica que queda como desecho, esto es que se adicionó una porción nueva de agua, se mantuvo con agitación magnética por 10 minutos con un reposo posterior del mismo tiempo, de tal forma de contar con nuevas porciones de fase acuosa de la misma masa cárnica, estas porciones se evaluaron bajo el esquema de extracción con éter etílico para su posterior determinación por espectroscopía.

La figura 15 presenta los espectros de absorción de la extracción A así como de las tres extracciones adicionales (B, C y D) que se efectuaron de las disoluciones y se observó que aún no hay una disolución completa dado que después de realizar la extracción y la determinación espectrofotométrica hay una absorbancia de cada fase analizada.

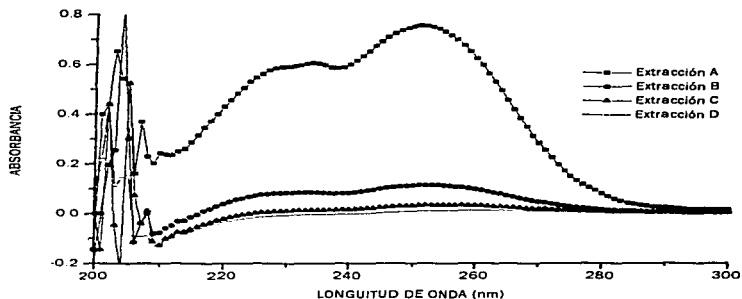


Figura 15. Espectros electrónicos de absorción obtenidos de las extracciones en una misma muestra de producto cárnico.

En la tabla 25 se presentan los porcentajes en peso de las extracciones realizadas determinando para la extracción A 0.114 % en peso que representa ser el 83 % de la extracción total que fue 0.137 % en peso, de ahí que las extracciones B y C representan el 13 % y el 2.9 % respectivamente y la D 0.7 %, esto indica que la disolución de los conservadores del producto cárnico no se esta llevando a cabo en su totalidad, sin embargo se aprecia que se optimiza con la extracción B.

**Tabla 25. Porcentajes en peso de las extracciones adicionales realizadas para recuperar los conservador de la muestra**

Extracción	% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K	% (p/ p) Total
A	0.073	0.041	0.114
B	0.018	0.006	0.018
C	0.002	0.002	0.004
D	0.001	0.001	0.001
Total	0.094	0.05	0.137

Con esta serie de resultados, se tuvo la necesidad de plantear una serie de condiciones que hicieran que la solubilización de los conservadores de la masa cárnica fuera cuantitativa con una sola porción de agua y así determinar el contenido real de conservador que presenta la muestra en estudio.

Las condiciones que se propusieron se presentan en la tabla 26 y se enfocan en cambiar el volumen de diluyente, temperatura y tiempo de agitación, estas condiciones se hicieron en combinación es decir que a una muestra se le adicionó el volumen indicado de diluyente, se llevó a la temperatura indicada y se mezcló por agitación magnética en el tiempo sugerido.

**Tabla 26. Condiciones para la disolución de conservadores del producto cárnico**

Muestra	Volumen de diluyente (mL)	Temperatura (* C)	Tiempo de agitación (minutos)
1	100	21	0
2	100	21	10
3	200	21	10
4	100	45	10

Después de realizar este procedimiento que corresponde a la primera etapa del análisis se prosiguió de manera convencional con la extracción con éter etílico y se efectuó la determinación por espectroscopía. De este análisis se determinó el porcentaje en peso de los conservadores que se presenta en la tabla 27.

**Tabla 27. Porcentajes en peso obtenidos con las condiciones de solubilización para la masa cárnica**

Muestra	% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K	% (p/ p) Total
1	0.093	0.056	0.149
2	0.099	0.058	0.157
3	0.108	0.063	0.171
4	0.109	0.058	0.159

El análisis de la tabla anterior muestra que el porcentaje en peso determinado es mayor con las condiciones que se emplearon para la muestra número 3 y además es mayor que el porcentaje total de 0.137 % que se determinó en el análisis anterior en donde se realizaron tres solubilizaciones extras.

Para confirmar que fue cuantitativo el proceso de solubilización con las condiciones de trabajo de la muestra 3, se realizó una segunda solubilización de la masa cárnica de desecho y como en los análisis anteriores se prosiguió con el método de extracción y evaluación espectrofotométrica, dando como resultado los espectros de absorción que se aprecian en la figura 16.

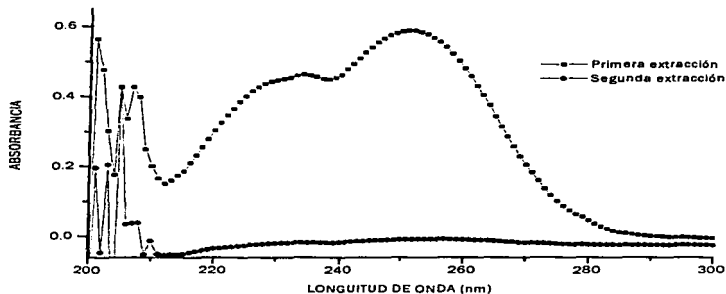


Figura 16. Espectros electrónicos de absorción de la muestra 3, obtenidos del análisis de solubilización en agua (etapa 1)

Del espectro de absorción obtenido al realizar una segunda solubilización se aprecia que no muestra respuesta en la longitud de onda de máxima absorción de los conservadores en estudio. Por lo cual se puede afirmar que hay una solubilización completa de los conservadores del producto cárnico con un volumen de diluyente de 200 mL, temperatura de 21° C y 10 minutos de agitación magnética en un peso de muestra de 10 g como se consideró desde el inicio de la optimización del método. En consecuencia pueden asumirse estas condiciones como favorables para optimizar el método AOAC.

### 6.9.9. Determinación simultánea

Hasta el momento se consiguió la optimización del método AOAC con dos cambios en el análisis que son:

- Cambio de solvente orgánico
- Solubilización de los conservadores del producto cárnico

Pero un factor adicional que hacía no evaluar de forma adecuada el porcentaje de conservador en una muestra problema y del cual se hizo referencia es un principio fue la interferencia espectral que presenta el benzoato de sodio por la presencia del sorbato de potasio, esto implica que cuando una muestra contenga los dos conservadores, se cuantifica una concentración extra para benzoato de sodio, ya que la sustancia de interferencia contribuye aditivamente a la absorbancia total, para contrarrestar esta contribución se debe cuantificar por determinación simultánea, una vez que las ecuaciones que se emplean bajo esta determinación consideran la contribución del soluto que interfiere como muestran las siguientes ecuaciones:

$$A^{\lambda_1} = \epsilon_{Bz}^{\lambda_1} C_{Bz} + \epsilon_{So}^{\lambda_1} C_{So} \quad \text{ec.(1)}$$

$$A^{\lambda_2} = \epsilon_{Bz}^{\lambda_2} C_{Bz} + \epsilon_{So}^{\lambda_2} C_{So} \quad \text{ec.(2)}$$

Las ecuaciones se resuelven para conocer la concentración de sórbico ( $C_{So}$ ) y benzoico ( $C_{Bz}$ ):

$$C_S = \left[ \frac{(\epsilon_{Bz}^{\lambda_2} * A^{\lambda_1})}{\epsilon_{Bz}^{\lambda_1}} - A^{\lambda_2} \right] / \left[ \frac{(\epsilon_{Bz}^{\lambda_2} * \epsilon_{So}^{\lambda_1})}{\epsilon_{Bz}^{\lambda_1}} - \epsilon_{So}^{\lambda_2} \right] \quad \text{ec.(3)}$$

$$C_B = (A^{\lambda_1} - \epsilon_{So}^{\lambda_1} C_{So}) / \epsilon_{Bz}^{\lambda_1} \quad \text{ec. (4)}$$

De estas ecuaciones se observa que se debe calcular la absorbancia molar de los dos componentes en estudio; sórbico ( $\epsilon_{So}$ ) y benzoico ( $\epsilon_{Bz}$ ) a dos longitudes de onda adecuadas ( $\lambda_{máx.}$ ), es decir a  $\lambda_1 = 226 \text{ nm}$  y  $\lambda_2 = 251 \text{ nm}$ .

Para observar cual es el efecto que causa cuantificar por interpolación con las curvas de calibración correspondientes de cada componente y por determinación simultánea, se diseñó un procedimiento de adición de estándares de benzoato de sodio con sorbato de potasio, guardando una relación de concentraciones es decir la concentración menor de benzoato de sodio con la concentración más baja de sorbato de potasio y así sucesivamente, obteniendo 6 adiciones de estándares, la tabla 28 muestra la concentración de cada estándar antes de la mezcla y el volumen que se tomó de cada solución estándar para realizar la mezcla, la determinación de los conservadores se realizó de manera convencional, es decir se llevó la fase acuosa a  $\text{pH} = 1$ , se realizó la extracción con éter etílico y se determinó por espectrofotometría.

**Tabla 28. Concentraciones de los estándares mezclados**

Adición de estándares	Benzoato de sodio $\mu\text{M}$	Sorbato de potasio $\mu\text{M}$	Volumen empleado de cada solución estándar NaBz : KSo (mL)
1	5.76	2.66	2:2
2	11.52	5.32	2:2
3	17.28	7.98	2:2
4	23.04	10.64	2:2
5	28.80	13.33	2:2
6	34.56	15.96	2:2

Una vez que se determinó la absorbancia por espectroscopía de la mezcla de estándares y con la determinación del coeficiente de absorción molar que representa en una recta de regresión lineal la pendiente, se realizó el cálculo para la cuantificación del porcentaje en peso de conservador por determinación simultánea con las ecuaciones 3 y 4, teniendo como resultado los que se exponen en la tabla 29.

La concentración calculada por determinación simultánea es muy similar a la concentración de la cual se partió presentadas en la tabla 28, la diferencia entre ellas esta dada únicamente por el ajuste de la regresión lineal.

**Tabla 29. Concentraciones calculadas por determinación simultánea**

Adición de estándares	Benzoato de Na	Sorbato de K
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
1	3.34	1.13
2	8.60	4.63
3	13.27	6.71
4	19.55	9.18
5	25.80	11.75
6	34.02	15.92

Pero para poder realizar el análisis de estos resultados es necesario llevar a cabo una comparación con los porcentajes en peso calculados por interpolación por las curvas de calibración correspondientes a cada compuesto y que se muestran en la tabla 30.

**Tabla 30. Concentraciones calculadas por interpolación con las curvas de calibración correspondientes a cada compuesto**

Adición de estándares	Benzoato de Na	Sorbato de K
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
1	6.53	1.54
2	13.93	5.13
3	19.88	7.28
4	27.67	9.86
5	35.49	12.53
6	46.27	16.84

Las observaciones a este análisis son: que la concentración calculada por curvas de calibración es mayor a la de la determinación simultánea, esta diferencia en

el resultado, se aprecia en el porcentaje en peso calculado para benzoato de sodio y no sucede así en los porcentajes en peso de sorbato de potasio. Y es que este resultado es lógico dado que en el porcentaje en peso de benzoato de sodio cuantificado por interpolación de curvas de calibración se determina la adición de la absorbancia consecuencia de la interferencia espectral del sorbato de potasio.

El análisis bajo el cual se determina el porcentaje que se esta determinando de más cuando la cuantificación se realiza por curvas de calibración, se evaluó a partir de considerar una concentración real y una aparente, que como se ha expuesto la primera se da por determinación simultánea y la concentración aparente es la calculada de curvas por tanto el porcentaje de cuantificación extra esta dado por:

$$\% \text{ extra} = ((C_{\text{aparente}} - C_{\text{real}}) / C_{\text{real}}) * 100; \text{ donde } C = \text{concentración}$$

obteniendo los resultados presentados en la tabla 31.

Con los resultados del cálculo anterior se tiene que el porcentaje extra en la determinación por curvas de calibración es del 41.22 % en benzoato de sodio y solo 7.10 % para sorbato de potasio, considerando solo los resultados que son constantes de la tabla 31 y que corresponden a las 4 últimas adiciones, ya que en los primeros dos resultados el porcentaje de cuantificación extra es superior debido al error que se da por no contar con un blanco adecuado y del cual se había dado una explicación en los análisis anteriores.

**Tabla 31. Porcentajes extras determinados por curvas de calibración**

Adición de estándares	% extra NaBz	% extra KSo
1	95.55	36.10
2	62.05	10.72
3	49.77	8.56
4	41.54	7.39
5	37.57	6.66
6	36.00	5.78
Promedio	41.22	7.10

#### 6.9.10. Porcentaje de cuantificación extra en muestras problema

El análisis anterior se realizó de la adición de estándares, sin embargo fue necesario evaluar este porcentaje de cuantificación extra en la muestra problema. Para ello se retomaron los resultados de absorbancia determinados en el apartado 6.9.8 y se cuantificaron por determinación simultánea con la finalidad de poder hacer una comparación con los porcentajes en peso determinados por interpolación en este apartado.

Los resultados de ambas cuantificaciones se agruparon en la tabla 32.

**Tabla 32. Concentraciones calculadas por interpolación con curvas y por determinación simultánea**

Muestra	Concentración por curvas		Concentración por determinación simultánea	
	% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K	% (p/ p) Benzoato Na	% (p/ p) Sorbato K
1	0.093	0.056	0.056	0.055
2	0.099	0.058	0.061	0.057
3	0.108	0.063	0.065	0.062
4	0.101	0.058	0.063	0.057

Con esta tabla de resultados se determinó el porcentaje extra en la determinación por curvas de calibración, siendo en promedio para benzoato de sodio 65.00 % y solo el 1.50 % para sorbato de potasio, como muestra la tabla 33.

**Tabla 33. Porcentaje de determinación extra en la muestra problema**

Muestra	% extra NaBz	% extra KSo
1	66.24	1.61
2	63.19	1.70
3	67.54	1.53
4	60.59	1.78
Promedio	65.00	1.50

Estos resultados permitieron confirmar que la interferencia espectral del sorbato de potasio repercute de manera considerable en la absorbancia total del benzoato de sodio, tal como se aprecia en la figura 17, en donde se traslapa la respuesta de absorbancia del sorbato de potasio en el intervalo de longitud de onda donde el benzoato de sodio presenta su máximo de absorbancia, de aquí que las muestras problema que presenten ambos conservadores, deberán ser cuantificadas por determinación simultánea.



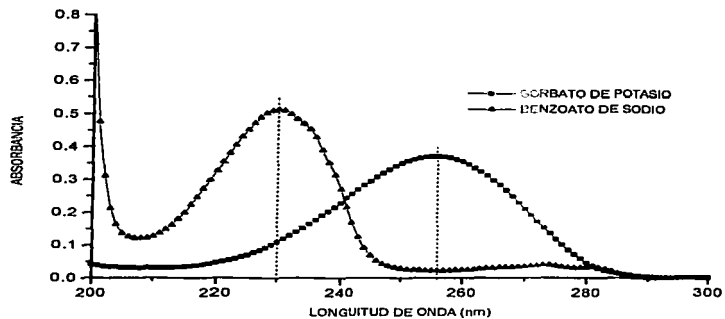


Figura 17. Espectros electrónicos de absorción de sorbato de potasio y benzoato de sodio

## **7. CONCLUSIONES**

### **7.1. Método AOAC**

Al realizar la determinación de conservadores benzoato de sodio y sorbato de potasio por un método de AOAC, se encontró que los porcentajes de recuperación de los conservadores eran del 50 % para benzoato de sodio y 37 % para sorbato de potasio, estos resultados se observaron cuando se realizó un análisis por adición estándar a muestras problema y muestras sin conservador. Dos son las causas a las que obedecen estos resultados; la primera a una escasa capacidad de extracción del éter de petróleo, dado que se encontraron rastros de conservador al realizar un incremento en el número de extracciones sucesivas en la etapa 4, esto quedó sustentando con los valores del coeficiente de reparto que resultaron ser de un valor numérico muy bajo y los cuales son: para benzoato de sodio  $D = 0.16$  y sorbato de potasio  $D = 0.05$ , la segunda causa estuvo determinada por la baja solubilización de los conservadores del producto cárnico, una vez que una solubilización extra de los conservadores a la masa cárnica mostró la presencia de ambos conservadores cuando se llevó a cabo el proceso de extracción y determinación por espectroscopía electrónica de absorción.

Factores adicionales además de los mencionados anteriormente determinaron que el método AOAC no era confiable para la determinación de conservadores como: formación de emulsiones a consecuencia del solvente orgánico y que llevaron al uso de etanol como antiemulsionante, interferencia espectral en el benzoato de sodio por la presencia del sorbato de potasio implicando considerar que la cuantificación debía realizarse por determinación simultánea.

Consecuencia de los factores mencionados se determinaron porcentajes en peso diferentes, esto al comparar los resultados de la muestra testigo empleada en la adición estándar con los del primer análisis realizado por el método AOAC y es que en la muestra testigo del análisis de adición estándar el porcentaje en peso determinado fue 0.087 % y en el primer análisis por AOAC 0.169 %.

El porcentaje en peso de 0.338 % obtenido después de cuantificar las porciones en donde se observó la presencia de conservadores, es un valor que no debe considerarse como real por todos los inconvenientes que presenta el método y que radican desde la curva de calibración hasta la contribución que el sorbato de potasio presenta en el benzoato de sodio. Estos aspectos son los que permiten concluir que el método AOAC es poco confiable.

### **7.2. Procedimientos A y B**

De los procedimientos que realiza el LNSP para la determinación de conservadores y que siguen de forma general el método AOAC, salvo las modificaciones en la relación de fases, pH y eliminación de grasas por uno de ellos se encontró que:

La relación de fases ( $\Phi = 1$ ), impide la distribución adecuada de los conservadores a la fase orgánica, debido a que se modifica el coeficiente de reparto. Al realizar una extracción en la cual el volumen de fase acuosa es igual al de fase orgánica, el disolvente se ve saturado impidiendo la extracción del analito problema, por tanto la hipótesis planteada por el LNSP de determinar con mayor confiabilidad el porcentaje en peso, al emplear todo el volumen de la solubilización de los conservadores, queda descartada y es que no se consideró que con ello disminuía la relación de fases que es un factor determinante en el proceso de extracción.

En relación al pH de la fase acuosa el LNSP no consideró que la cantidad de ácido clorhídrico adicionado para llevar a la forma ácida los conservadores debía tomar en cuenta el volumen empleado para la extracción, así que los procedimientos bajo los cuales se determinaban los conservadores se hacían en  $\text{pH} = 2$ . La consecuencia de trabajar en un  $\text{pH} = 2$  es que el porcentaje de extracción de los conservadores disminuye.

Del procedimiento B, en donde se adiciona hidróxido de sodio para evitar emulsiones en el proceso de extracción se concluye que; la extracción con el solvente orgánico para la eliminación de lípidos en este medio básico no se realiza, pero además la formación de emulsión no es consecuencia de los lípidos sino del disolvente, éter de petróleo, ya que al cambiar a éter etílico la emulsión desaparece.

Se concluye por tanto que los análisis realizados entorno a la determinación de conservadores:

- ❖ Los procedimientos A y B modificados por el Laboratorio Nacional de Salud Pública con base al método AOAC, no son una alternativa para realizar el análisis cuantitativo de conservadores.
- ❖ El método AOAC que mostró extracción poco cuantitativa por un problema de solubilización de los analitos del producto analizado, coeficiente de reparto con un valor numérico muy bajo e interferencia espectral, es de considerar para la determinación de los conservadores benzoato de sodio y sorbato de potasio en productos cárnicos.

### 7.3. Optimización del método AOAC

Los argumentos anteriores llevaron a la optimización del método AOAC bajo una serie de condiciones que mostraron favorecer la cuantificación al obtener un porcentaje de extracción del 94%.

Sin embargo un aspecto a considerar de la determinación de conservadores es que el porcentaje en peso cuantificado por el método AOAC (0.169 %) y por el método optimizado de AOAC (0.171 %) se encuentran fuera del límite máximo establecido por la NOM-122 que indica, que la suma de los conservadores no deberá ser mayor de 0.1 %. Estos valores son de consideración dado que representan un 70 % más del valor que se establece y pueden ser un riesgo para el consumidor, además dentro del

análisis de calidad puede enmascarar malas prácticas de manufactura, incrementar vida de anaquel, entre algunos de los aspectos que se pueden considerar.

Los resultados presentados en el párrafo anterior podrían hacer pensar que si en ambos análisis se obtiene el mismo resultado, no es necesario la optimización del método, sin embargo no debe perderse de vista que en el análisis por el método AOAC son los factores analizados los que dan poca confiabilidad al método, que posiblemente los errores en las curvas, la contribución del sorbato de potasio sobre el benzoato de sodio, llegan a contrarrestar los resultados y por eso se obtienen valores similares, pero no siempre puede resultar así y como consecuencia se establece la optimización del método AOAC.

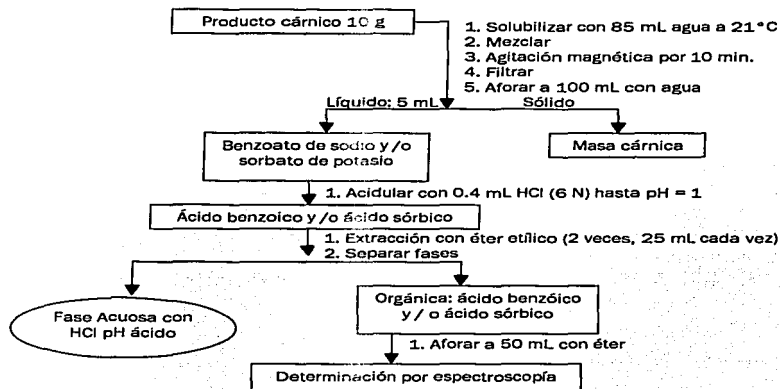
En base a esos resultados el análisis para los conservadores se propone bajo el siguiente esquema de trabajo que sigue de manera ordinaria como el método AOAC, la técnica de extracción con solvente orgánico seguida de una determinación espectrofotométrica. Los cambios se encuentran situados principalmente en el solvente orgánico de éter de petróleo a éter etílico, forma de disolución de los analitos del producto cárnico, que involucra; volumen de diluyente, temperatura y agitación magnética.

Los diagramas A y B muestran las condiciones del método optimizado para la determinación de conservadores en productos cárnicos y la forma de la construcción de las curvas de calibración respectivamente, con los cuales se permite una extracción cuantitativa.

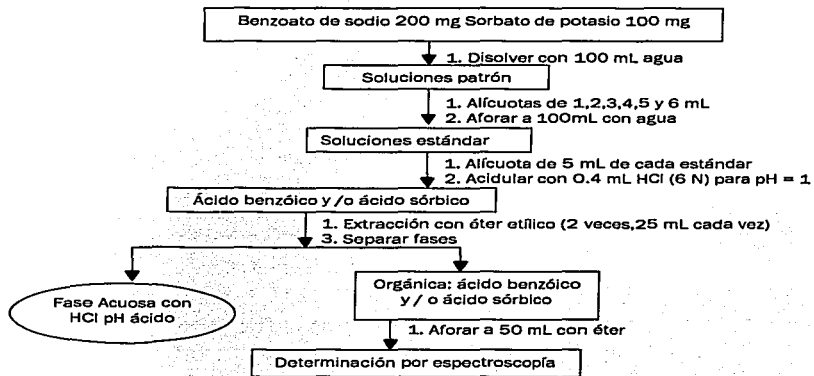
Dado que la interferencia espectral que el sorbato de potasio ejerce sobre el benzoato de sodio es el 65 % se propone que la cuantificación sea por determinación simultánea siempre que las muestras en estudio presenten los dos conservadores: benzoato de sodio y sorbato de potasio.

Quando no sea así es factible cuantificar por interpolación con la curva de calibración del conservador registrado y los cuales presentan su máximo de absorción en la longitud de onda de 226 nm y 251 nm para ácido benzóico y ácido sórbico respectivamente en éter etílico. Dentro de este aspecto la concentración calculada corresponderá exclusivamente al conservador presente.

DIAGRAMA A. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO AOAC PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZOATO DE SODIO Y SORBATO DE POTASIO EN PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS



**DIAGRAMA B. ANÁLISIS DE ESTÁNDARES: BENZOATO DE SODIO Y SORBATO DE POTASIO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN CON ÉTER ETÍLICO**



## 8. RECOMENDACIONES

Como se establece en este trabajo uno de los factores que determina que tan efectivo será el conservador contra los microorganismos, es el pH. La gran mayoría de los conservadores que se emplean en la industria de alimentos son sustancias con propiedades ácido-base, siendo la especie protonada la de mayor actividad antimicrobiana.

Sin embargo en casi todos los procesos de elaboración de alimentos es usada la base conjugada de sodio o potasio del conservador, debido fundamentalmente a la gran solubilidad de estas sales en agua. Esto limita la actividad del conservador de acuerdo con el valor de pH que el alimento presenta. Es importante entonces conocer el nivel de acidez (pH) que un alimento tiene antes de añadir el conservador, de esta manera es posible decidir cual es el conservador más recomendable para cada producto.

A continuación se presenta una tabla con los valores de pH informados en la literatura para lograr una buena actividad antimicrobiana de los conservadores.

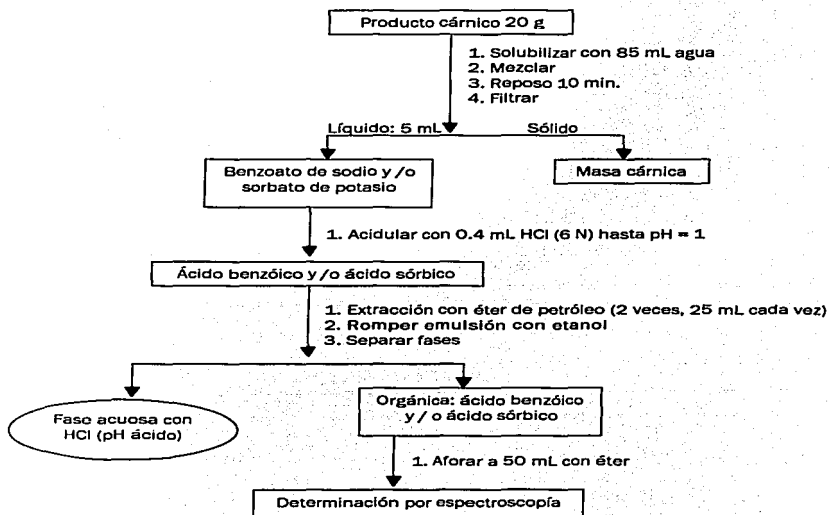
Conservador	Límite más alto de pH para usarse como conservador efectivo
Benzoatos	4.5
Propionatos	5.5
Ácido sórbico y sorbatos	6.5
Parabenos	8.0

Considerando este aspecto y que existe una amplia gama de conservadores, la determinación de estos en un alimento se sugiere no sea exclusivo para benzoato de sodio y sorbato de potasio, sino también para aquellos conservadores en los cuales su actividad óptima se encuentre en el intervalo de pH del alimento.

## 9. APÉNDICE

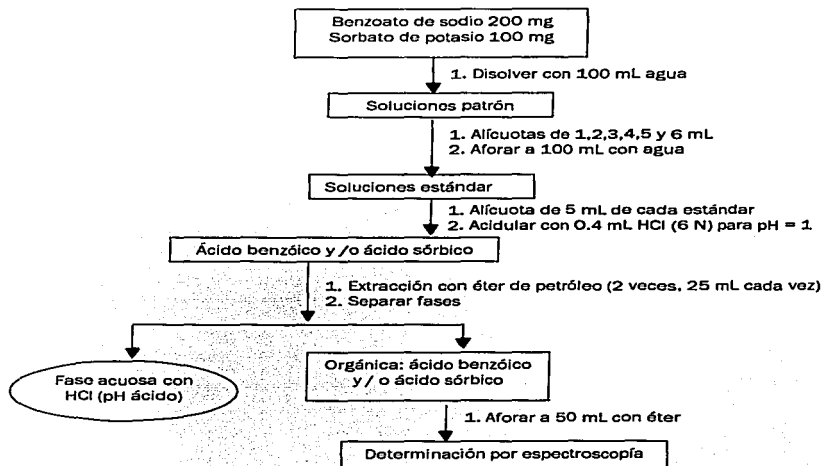
### 9.1. DIAGRAMAS DE BLOQUE

DIAGRAMA 1. MÉTODO ADAC

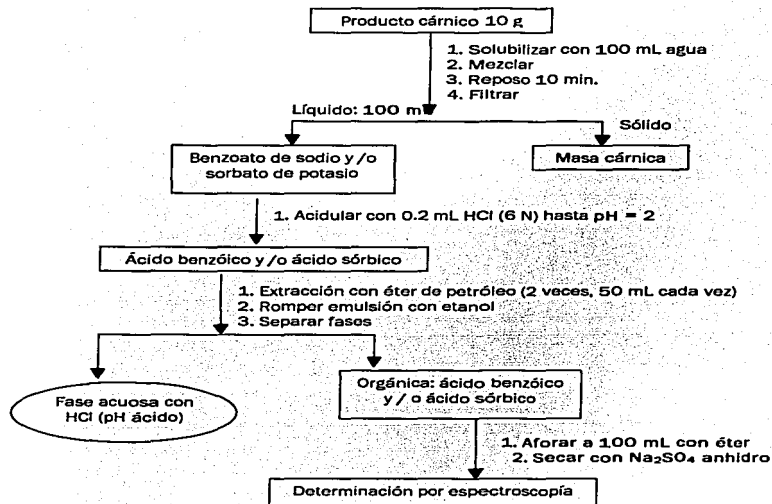




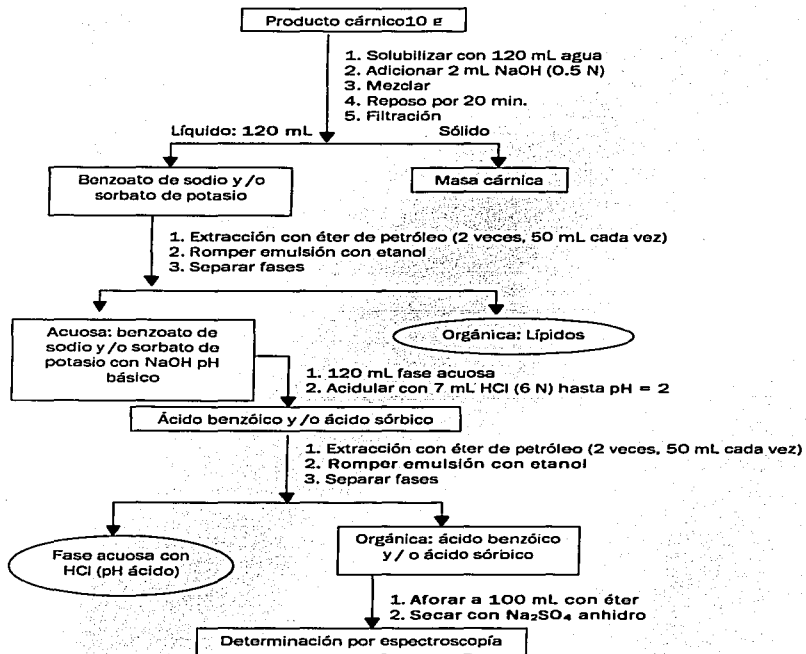
**DIAGRAMA 2. ANÁLISIS DE ESTÁNDARES: BENZOATO DE SODIO Y SORBATO DE POTASIO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN POR EL MÉTODO AOC**



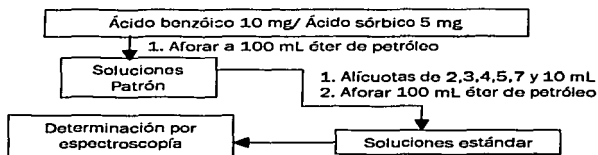
### DIAGRAMA 3. PROCEDIMIENTO A



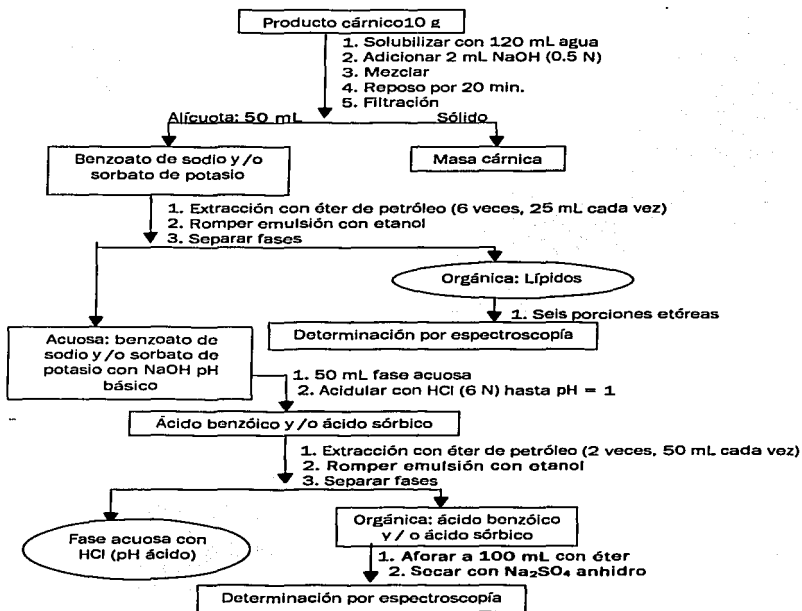
**DIAGRAMA 4. PROCEDIMIENTO 8**



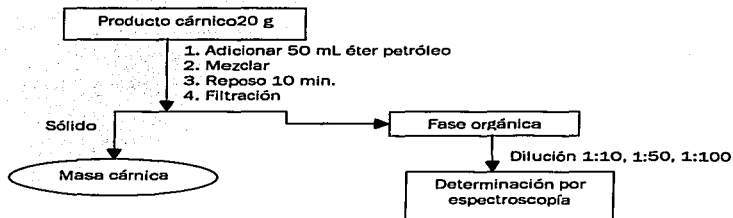
**DIAGRAMA 5. ANÁLISIS DE ESTÁNDARES: ÁCIDO BENZOÍCO Y ÁCIDO SÓRBICO EN ÉTER DE PETRÓLEO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN**



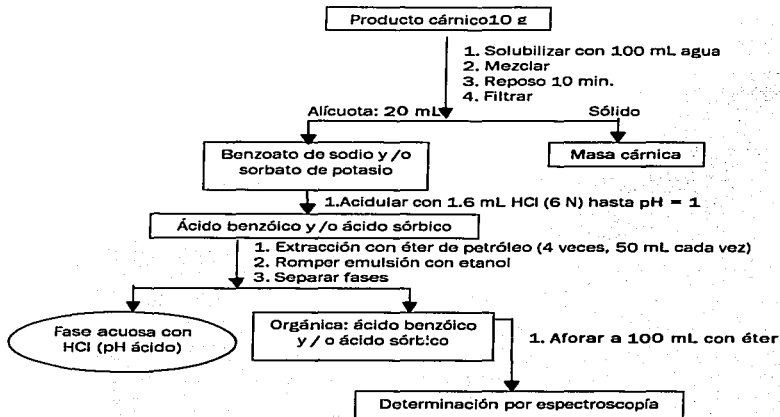
**DIAGRAMA 6. EVALUACIÓN DE LÍPIDOS**



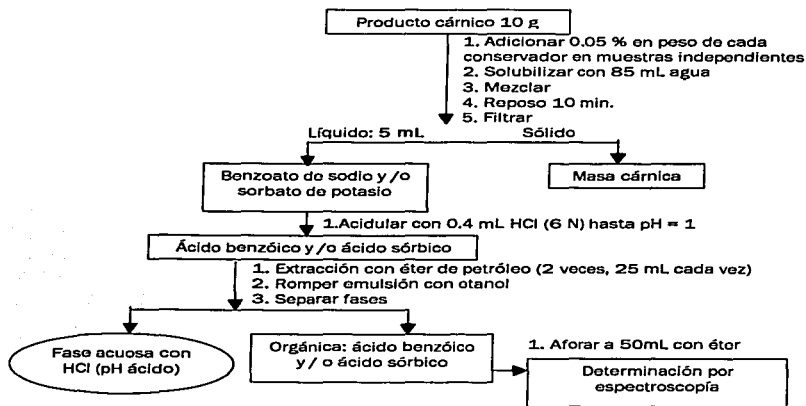
**DIAGRAMA 7. PATRÓN DE REFERENCIA DE LÍPIDOS**



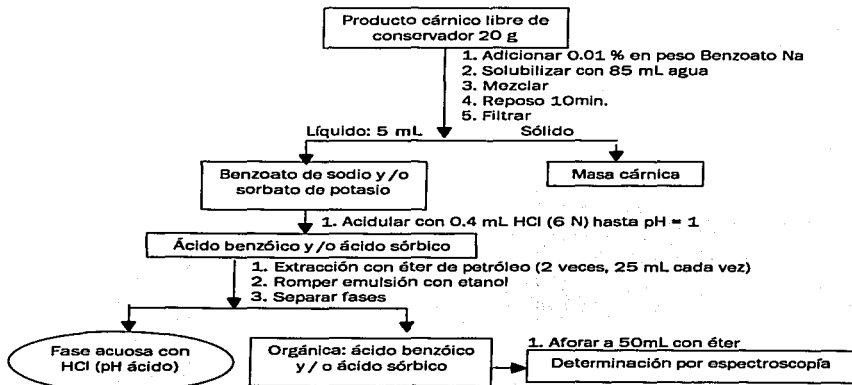
**DIAGRAMA 8. EVALUACIÓN DE PH Y RELACIÓN DE FASES (♦)**



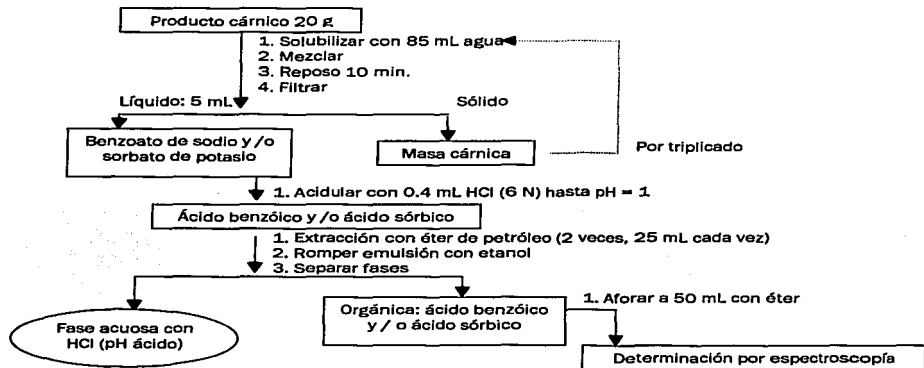
**DIAGRAMA 9. ADICIÓN ESTÁNDAR EN MUESTRA PROBLEMA**



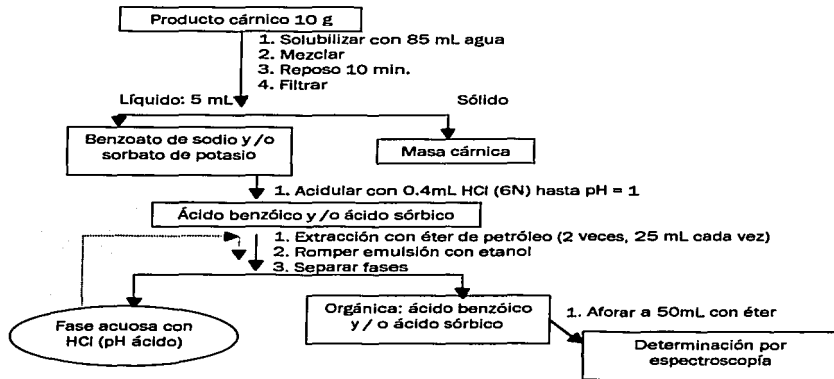
**DIAGRAMA 10. ADICIÓN ESTÁNDAR EN MUESTRA LIBRE DE CONSERVADOR**



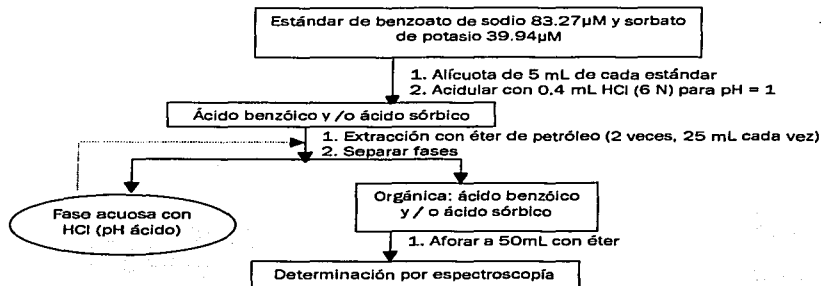
**DIAGRAMA 11. SOLUBILIZACIÓN DE CONSERVADORES CONTENIDOS EN LA MASA CÁRNICA, (ETAPA 1)**



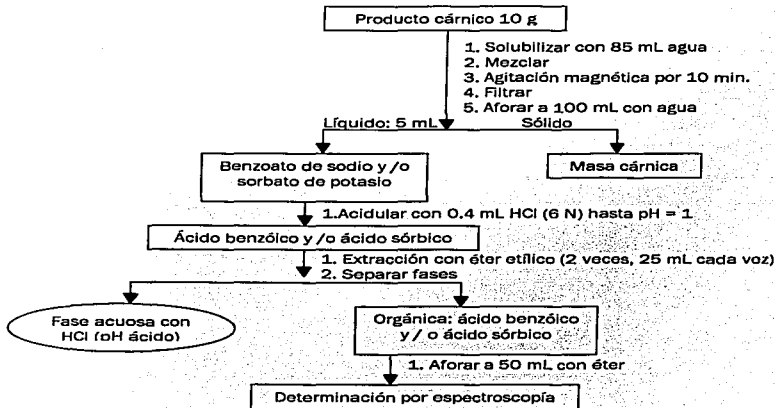
**DIAGRAMA 12. INCREMENTO DEL NÚMERO DE EXTRACCIONES SUCESIVAS "n" EN LA ETAPA 4**



**DIAGRAMA 13. INCREMENTO DEL NÚMERO DE EXTRACCIONES SUCESIVAS "n" EN LOS ESTÁNDARES DE BENZOATO DE SODIO Y SORBATO DE POTASIO**

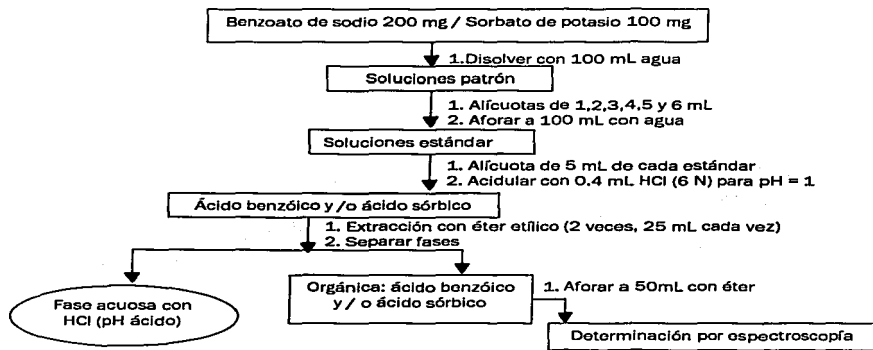


**DIAGRAMA 14. MÉTODO AOAC CON ÉTER ETÍLICO**

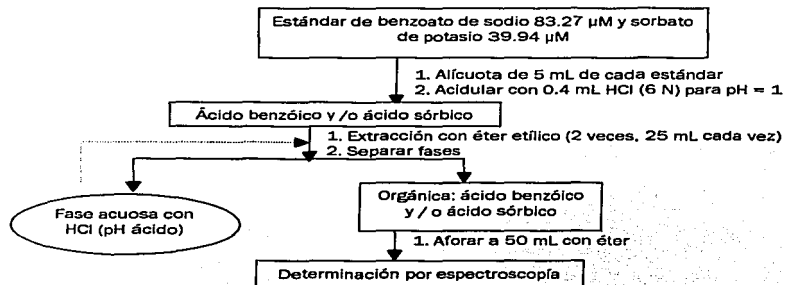




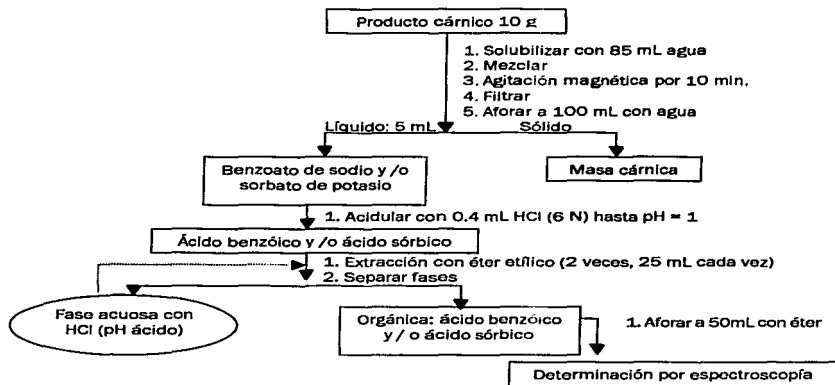
**DIAGRAMA 15. EXTRACCIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE BENZOATO DE SODIO Y SORBATO DE POTASIO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN CON ÉTER ETÍLICO**



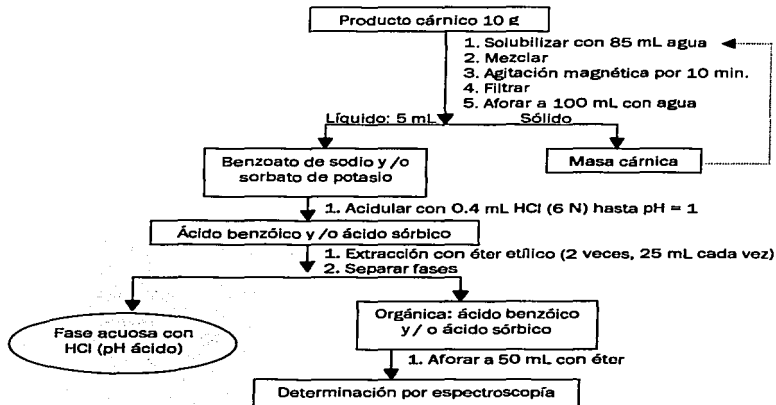
**DIAGRAMA 16. INCREMENTO DEL NÚMERO DE EXTRACCIONES SUCESIVAS "n" EN LOS ESTÁNDARES DE BENZOATO DE SODIO Y SORBATO DE POTASIO CON ÉTER ETÍLICO EN LA ETAPA 4**



**DIAGRAMA 17. INCREMENTO DEL NÚMERO DE EXTRACCIONES SUCESIVAS "n" EN UNA MUESTRA DE PRODUCTO CÁRNICO EN LA ETAPA 4 CON ÉTER ETÍLICO**



**DIAGRAMA 18. SOLUBILIZACIÓN DE LOS CONSERVADORES CONTENIDOS EN LA MASA CÁRNICA , ( ETAPA 1)**



**DIAGRAMA 19. MÉTODO OPTIMIZADO DE AOAC**

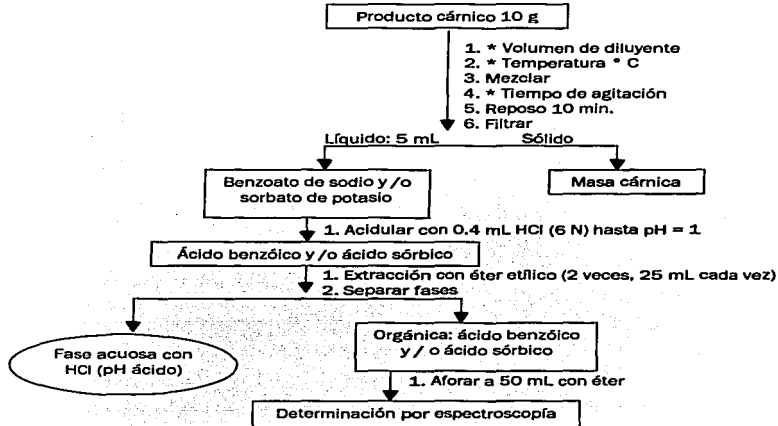
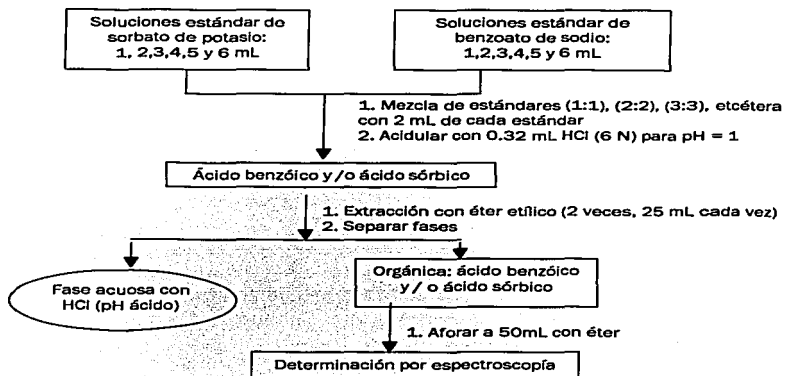


Tabla de condiciones

Extracción	Volumen de diluyente (mL) 1*	Temperatura (° C) 2*	Tiempo de agitación (minutos) 4*
1	100	21	0
2	100	21	10
3	200	21	10
4	100	45	10

**DIAGRAMA 20. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA A PARTIR DE ADICIÓN DE ESTÁNDARES**



## 9.2 REACTIVOS Y MATERIAL

### Reactivos

- Sulfato de sodio anhidro grado reactivo analítico. (Merck A.G)
- Hidróxido de sodio lentejas grado reactivo analítico. (J.T. Baker)
- Ácido clorhídrico 99.9 % (Merck A.G)
- Alcohol etílico absoluto grado reactivo analítico. (Merck A.G)
- Alcohol metílico 99.8 % grado reactivo analítico. (Merck A.G)
- Éter etílico anhidro grado reactivo analítico. (Merck A.G)
- Éter de petróleo grado reactivo analítico. (Merck A.G)
- Estándar de ácido benzóico grado U.S.P. (Sigma)
- Estándar de ácido sórbico grado U.S.P. (Sigma)
- Estándar de benzoato de sodio grado U.S.P. (Sigma)
- Estándar de sorbato de potasio grado U.S.P. (Sigma)

### Material de Laboratorio

- Vasos de precipitados de 50 y 250 mL
- Probeta de 100 mL
- Agitador de vidrio
- Embudos de filtración
- Pipetas volumétricas 1, 2, 3, 4,5 y 6 mL
- Pipetas serológicas de 1 y 2 mL
- Embudos de separación 100 mL
- Matraces volumétricos de 50, 100 y 200 mL

### Equipo

- Medidor de pH
- Placa de calentamiento con agitador magnético Thermolyne NUOVA II
- Espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 600 con celdas de cuarzo
- Balanza analítica Sartorius con sensibilidad de  $\pm 0.1$  mg

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Desrosier, W.N. Conservación de los Alimentos. Ed. C.E.C.S.A. México 1986.
- <sup>2</sup> Facts United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (F.S.I.S.), U.S.A. 1988.
- <sup>3</sup> Garduño. Guía para la Selección de Agentes Conservadores de los Alimentos. Industria Alimentaria. Vol.1 No. 3 /5. Junio /Agosto 1979.
- <sup>4</sup> Furia, E.T. Handbook of Food Additives. Ed. CRC Press, Inc. Cleveland, Ohio. 1975.
- <sup>5</sup> Tecnología Alimentaria. Conservadores para Alimentos y Bebidas. Vol.30, No.3 1995.
- <sup>6</sup> Kramlich, W.E. Pearson, A.M. Tauber, F.W. Processed Meat, Ed. Avi Publishing, Co, Inc. Westport, Conn.1980.
- <sup>7</sup> FAO / WHO, Food Additives Data System, Roma 1984.
- <sup>8</sup> Weining, H., Gutmatcher, E. Tecnología Práctica de la Carne, Ed. Acribia, Zaragoza, España 1973.
- <sup>9</sup> Food Protection Committes, Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences-National Research Counsil. Chemical Uses in Food Processing. U.S.A. 1965.
- <sup>10</sup> Hobbs, B.C. Higiene y Toxicología de los Alimentos, Ed. Acribia, Zaragoza, España. 1971.
- <sup>11</sup> Diario Oficial de la Federación, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Tomo DLI No. 11, Enero, 18. México, 1988.
- <sup>12</sup> Diario Oficial de la Federación, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, Tomo CDXII No. 6, Agosto, 9. México, 1999.
- <sup>13</sup> Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
- <sup>14</sup> Baduñ, D.S. Química de los Alimentos, Ed. Alambra Mexicana, S.A. México 1984.
- <sup>15</sup> Fields, M.L. Fundamentals of Food Microbiology. Avi Publishing, Co. Westport, Conn. 4:177. 1977.
- <sup>16</sup> Price, J.F. Ciencia de la Carne y Productos Cárnicos, Ed. Acribia, Zaragoza, España. 1976.
- <sup>17</sup> Sofos, J.N. Antimicrobial Effects of Sodium and Others Ions in Foods. A. Review, J. Food Safety, 6:45. 1984.
- <sup>18</sup> Nickerson, J.T., Siskey, A.J. Microbiology of Food and Food Processing American Elsevier Publishing. New York. 57:102, 1975.
- <sup>19</sup> Galli. C., Pauletti. R., Vettorassi. G. Chemical Toxicology of Food. Vol.3. Elsevier / North-Holland Biomedical Press. Ámsterdam, New York, Oxford. 16:276.1978.
- <sup>20</sup> Sofos, J.N., Busta, F.F., Sorbates in Antimicrobials In Foods. Marcel Dekker, Inc. New York, 25:73. 1983.
- <sup>21</sup> Lucock, E. Sorbic Acid as a Food Additives, Characteristics, Uses, Effects. Pringer-Verlag Publishing Co. Berlín Neidelberg New York, 10:269, 1980.
- <sup>22</sup> Ayres, J.C. Impact of Toxicology on Food Processing. Ed. Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. 1981.
- <sup>23</sup> Desrosier, W.N. Elementos de Tecnología de Alimentos. Ed. C.E.C.S.A. México 1983.