

ANÁLISIS DE CONSERVADORES EN QUESOS PARTE I: DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

Perotti, M. C. y Bernal, S. M.

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)

Facultad de Ingeniería Química.

Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Santiago del Estero 2829. S3000AOM Santa Fe (Argentina)

Tel.: 0342 4530302. Tel-fax.: 0342 4571162.

e-mail: cperotti@fiquis.unl.edu.ar

Palabras clave:

conservadores,

espectroscopía UV,

regresión lineal múltiple.

RESUMEN

En el presente trabajo se propone la espectrofotometría UV para la determinación de ácido sórbico en quesos. Esta metodología contempla su cuantificación junto con la de los ácidos benzoico y salicílico que pueden utilizarse, inadecuadamente en este caso, como conservadores. Para tal fin se empleó una técnica de separación por destilación con inyección de vapor optimizándose condiciones tales como volumen de destilado, tiempo de destilación y empleo de sales. La cuali y cuantificación posterior se realizó por espectrometría de absorción molecular del destilado en la región ultravioleta cercano. Los resultados procesados por regresión lineal múltiple mostraron altos porcentajes de recuperación para los tres conservadores, con lo que se logró la detección y la cuantificación de los mismos. También se obtuvo una ecuación de calibración por regresión lineal simple para las muestras en las que está presente solamente el ácido sórbico.

Se consiguió una técnica sencilla y rápida, alternativa a los métodos cromatográficos, que puede ser implementada como método de rutina en laboratorios de control.

Trabajo recibido el 17-09-04 y aceptado para su publicación el 06-10-05

PRESERVATIVE ANALYSIS IN MILK PRODUCTS PART I: DETERMINATION IN CHEESES BY UV SPECTROSCOPY

Perotti, M. C.* y Bernal, S. M.

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)

Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Santiago del Estero 2829. S3000AOM Santa Fe (Argentina)

Tel.: 0342 4530302. Tel-fax.: 0342 4571162. e-mail: cperotti@fiquis.unl.edu.ar

SUMMARY

In the present paper a method for sorbic acid determination in cheese is proposed. This methodology is based on UV spectrophotometry, and allows the sorbic acid determination besides to benzoic and salicylic acids, inadequately used as preservative in cheeses.

For this propose a distillation by steam injection was employed, and variables such as distillate volume, distillation time and salts used, were established. Quali and quantitative analysis were performed by molecular absorption spectrometry of distillate in the near UV region. The lineal multiple regression shown a high recuperation for the three preservative, allowing their detection and quantification.

A equation of calibration by lineal simple regression was obtained for cheese samples with sorbic acid only.

The resulting methodology was easy and fast and represents a valid alternative to the chromatographic methods. It can be used easily in food control laboratories.

Key words: preservatives, spectroscopy UV, Multiple Lineal Regression.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de los aditivos alimentarios, los que se usan con la finalidad de conservar desempeñan una función importante, ya que los desarrollos microbianos son la principal causa de deterioro de los alimentos y/o de riesgo sanitario.

Los ácidos sórbico y benzoico suelen utilizarse con esta finalidad, asociados o en forma independiente según el tipo de alimento, para evitar fundamentalmente el desarrollo de mohos y levaduras. Otro ácido orgánico que se empleó como conservador antifúngico es el ácido salicílico que, si bien actualmente no integra la lista positiva de nuestra legislación, puede llegar a adicionarse en forma ilegal, debido a su alta eficiencia.

De los tres compuestos mencionados, en quesos sólo se admite el ácido sórbico (código Alimentario Argentino), que se puede encontrar en la masa del mismo ya que es incorporado en la leche de elaboración. Dada la importante contaminación fúngica que pueden sufrir los quesos en su parte externa y que es necesario evitar, pueden utilizarse inadecuadamente los ácidos benzoico y salicílico, debido a su bajo costo y a que son fácilmente asequibles.

En el presente trabajo se proponen dos procedimientos basados en la misma metodología para la determinación de ácido sórbico en quesos:

a) uno es aplicable sólo al control de calidad de la industria que conoce la historia previa de sus quesos y,

b) el otro procedimiento, que también se puede utilizar para el caso anterior, es aplicable fundamentalmente al control legal de quesos, en donde no sólo se cuantifica el ácido sórbico sino que también se pueden detectar y cuantificar los otros dos ácidos adulterantes.

La metodología emplea una técnica separativa de destilación y la espectrometría UV, y los procedimientos difieren únicamente en el tratamiento estadístico empleado en el análisis de los resultados. Esta técnica puede aplicarse debido a que se determinó experimentalmente que no existen sustancias interferentes en los destilados de distintos tipos de quesos (ausencia de sustancias destilables que absorban en el rango de UV utilizado).

En el primer caso se empleó la regresión lineal simple (RLS) para el cálculo de la concentración del ácido sórbico obtenido en el destilado. Para el segundo caso, con la aplicación de la regresión lineal simple (RLS) no se pondría en evidencia la adulteración con los ácidos benzoico y salicílico. Para ello se propone el empleo de una herramienta estadística multivariada como la regresión lineal múltiple (RLM) para la detección y cuantificación simultánea de los tres ácidos en el destilado. Si bien las dos metodologías estadísticas luego de optimizadas son sencillas de aplicar, la RLM implica una etapa de calibración de mayor complejidad que la RLS.

La metodología que se propone (destilación - espectroscopía UV) constituye una alternativa de los métodos cromatográficos que se usan para el análisis de conservadores en alimentos (1, 2, 3).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Reactivos y equipamiento

Se emplearon soluciones patrones de benzoato de sodio, salicilato de sodio y sorbato de potasio, en concentraciones de 1 mg/mL en su forma ácida; sulfato de magnesio y cloruro de sodio*; ácido sulfúrico 2,5 % v/v y ácido clorhídrico 0,1 N. Los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

* Si bien el NaCl utilizado como sal de mesa es de alta pureza, no puede ser usado en esta técnica debido a que la misma contiene sustancias que pueden interferir en esta determinación (art. 1272, CAA).

Se empleó un espectrofotómetro UV-Visible (Metrolab modelo 1700, Argentina); equipo de destilación rápido por arrastre con vapor (Figura 1); pipetas automáticas y materiales normales de laboratorio.

Para el tratamiento estadístico de los datos se empleó el software The Unscrambler 7.6 (CAMO ASA, Estados Unidos).

II.2 Optimización de procedimientos de cuantificación por espectrometría UV

II.2.1 Cuantificación del ácido sórbico por RL⁵

Se realizó el espectro de la solución de ácido sórbico en el intervalo 200 - 310 nm partiendo de la solución patrón de sorbato de potasio acidificada con HCl (pH ~ 2), con la finalidad de seleccionar la longitud de onda de máxima absorbancia para el análisis cuantitativo, la que correspondió a 265 nm. Se realizó la curva de calibrado a dicha longitud de onda y se verificó linealidad hasta una concentración de 10 µg/mL (4).

II.2.2 Cuantificación del ácido sórbico junto a los ácidos benzoico y salicílico por RLM

Se realizaron los espectros de los otros ácidos en el intervalo 200 - 310 nm de la misma manera que para el ácido sórbico, con la finalidad de seleccionar las longitudes adecuadas para el análisis cuantitativo. Los máximos de absorción característicos se encontraron a 230 nm para el ácido benzoico, 210, 240 y 300 nm para el ácido salicílico. Para los dos componentes también se verificó linealidad hasta valores de concentración cercanos a 10 µg/mL, a las longitudes de onda indicadas (4).

Para la cuantificación simultánea de los ácidos sórbico, benzoico y salicílico, se aplicó el método de regresión lineal múltiple (RLM) utilizando las longitudes de onda seleccionadas en el análisis espectral. Esta herramienta estadística es muy utilizada en el análisis cuantitativo de datos espectrales en donde una variable respuesta se relaciona con varias variables experimentales independientes. En una primera etapa se realizó la calibración con el propósito de obtener el modelo matemático que relacione la concentración (variable dependiente) con la absorbancia (variable independiente) (5, 6, 7). Con esta finalidad se emplearon soluciones mezcla de los tres componentes en tres niveles de concentración, bajos (1 µg/mL), medios (3 µg/mL) y altos (6 µg/mL), dentro del rango de linealidad estudiado (0-6,5 µg/mL), para lo cual se empleó un diseño factorial completo (27 soluciones). Se realizaron las lecturas de absorbancia a 210, 230, 240, 265 y 300 nm, para las 27 mezclas obtenidas según lo indicado. Estos datos se

emplearon en la obtención de dos modelos de RLM. En una segunda etapa se realizó la validación, donde se aplicaron los modelos de calibración obtenidos para estimar la concentración de los componentes de una muestra incógnita. Para ello se empleó la validación interna o cruzada, método estadístico que se usa para obtener una valoración objetiva de la magnitud de los errores de predicción (6, 7). En este método de validación una muestra del set de calibración se excluyó para obtener el modelo y se empleó para su predicción. El procedimiento se repitió hasta que las 27 muestras se excluyeron una vez.

Se calcularon los dos modelos de RLM de acuerdo con el número de variables independientes (longitudes de onda) utilizadas en cada caso. En el modelo 1 se trabajó con 3 longitudes de onda, 230 nm para benzoico, 265 para sórbico y 300 nm para salicílico, esta última seleccionada por ser la de menor superposición espectral de las tres longitudes características del mismo. En el modelo 2 se adicionaron a las longitudes de onda empleadas en el modelo anterior, las otras dos longitudes características del ácido salicílico, 210 y 240 nm, obteniéndose de esta manera una ecuación de RLM con 5 variables.

II.3 Optimización de la técnica de destilación

Debido a que compuestos presentes en los quesos interfieren en la cuali y cuantificación de los conservadores por espectroscopía UV, ya sea por turbiedad o absorción, fue necesario emplear un método de aislación de los mismos. Con esta finalidad se empleó el método de destilación con inyección de vapor, usado por técnicas normalizadas para los ácidos sórbico y benzoico (9, 10). Para ello se utilizó un equipo de destilación rápido con inyección de vapor, disponible en el laboratorio (11), que permitió la destilación de 500 mL en 30 minutos aproximadamente. Para asegurar que los conservadores estuvieran en su forma ácida y lograr el arrastre de los mismos en el proceso de destilación, se trabajó a $\text{pH} \leq 2$ (9, 10, 12).

Con el propósito de corroborar que el método separativo seleccionado junto a la espectroscopía UV puede ser aplicado a este alimento, se realizaron destilaciones con muestras de quesos sin aditivos conservadores (blanco de muestra) y de diferente grado de maduración, en las condiciones detalladas más adelante. Se observó en todos los casos que los destilados de quesos no presentaron interferencias de compuestos volátiles que absorbían en las longitudes de onda estudiadas (210, 230, 240, 265 y 300 nm). Debido a que los ácidos grasos libres de cadena media provenientes del proceso de lipólisis son arrastrables por destilación e insolubles en agua, cuando se trabajó con quesos lipolizados fue necesario realizar una filtración por papel del destilado, ya que la turbiedad interfiere en la lectura UV.

Se trabajó, además, con adición estándar de soluciones patrón de los tres compuestos de interés, que se adicionaron en forma individual y conjunta a las muestras de quesos. Se estudiaron las mejores condiciones de trabajo de manera de conseguir altos porcentajes de recuperación en los destilados, que se analizaron por espectrometría UV. Las cantidades adicionadas de conservadores fueron correspondientes al doble del valor de 1.000 ppm establecido en el CAA para el ácido sórbico en quesos. Todas las expe-

riencias de destilación se realizaron con el agregado de ácido sulfúrico (pH ≤ 2); en algunos casos se utilizaron sales para saturar la solución a destilar de manera de conseguir un mejor rendimiento de dicho proceso, y se probaron distintos volúmenes de destilado. Las sales empleadas fueron $MgSO_4$, propuesto por algunas técnicas de referencia (9, 10) y NaCl, que se seleccionó por su menor costo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Cuantificación del ácido sórbico por RLS

La ecuación de la curva de calibrado del ácido sórbico a 265 nm es la siguiente: $y = 0,007 + 0,2291 X$ ($R^2 = 0,9998$), donde "y" es la absorbancia del destilado y "X" es la concentración en $\mu g/mL$ (4).

III.2 Cuantificación de los tres ácidos por RLM

Para el análisis simultáneo de los tres componentes, en la etapa de calibración se desarrollaron 2 modelos matemáticos de regresión lineal múltiple a partir de matrices de datos espectrales obtenidas de las 27 muestras. Los modelos obtenidos son los siguientes:

modelo 1

$$C_{ben} (\mu g/mL) = -0,1329 + 11,3679 A_{230nm} - 0,7668 A_{265nm} - 19,321 A_{300nm}$$

$$C_{sal} (\mu g/mL) = 0,4181 - 0,4739 A_{230nm} - 1,7898 A_{265nm} + 35,7502 A_{300nm}$$

$$C_{sor} (\mu g/mL) = 0,059076 - 0,3431 A_{230nm} + 4,335 A_{265nm} + 0,09586 A_{300nm}$$

modelo 2

$$C_{ben} (\mu g/mL) = -0,05622 - 0,6933 A_{210nm} + 9,5251 A_{230nm} + 2,7014 A_{240nm} - 1,4836 A_{265nm} - 17,3027 A_{300nm}$$

$$C_{sal} (\mu g/mL) = 0,075729 + 4,9684 A_{210nm} - 1,8002 A_{230nm} - 0,307 A_{240nm} - 0,4982 A_{265nm} + 8,0239 A_{300nm}$$

$$C_{sor} (\mu g/mL) = 0,0765 - 0,4117 A_{210nm} - 0,3614 A_{230nm} + 0,2686 A_{240nm} + 4,1603 A_{265nm} + 2,3348 A_{300nm}$$

Los parámetros estadísticos, pendiente, coeficientes de correlación de la calibración y de la validación cruzada y raíz cuadrada de los errores de calibración (RMSEC) obtenidos en los dos modelos al representar la concentración predicha versus la concentración real para cada conservador, se observan en la Tabla 1. En los 2 casos se obtuvieron muy buenos coeficientes de correlación para la calibración y la validación cruzada; sin embargo, se seleccionó en este trabajo el modelo 2 para calcular las concentraciones de los tres compuestos ya que para el mismo se obtuvieron los mejores parámetros.

TABLA 1.

Parámetros obtenidos para los distintos modelos de RLM

Compuesto	Parámetro	Modelo 1(3 long)	Modelo 2(5 long)
Ácido sórbico	b	0,9980	0,9983
	R _C	0,9990	0,9992
	R _{VC}	0,9980	0,9984
	RMSEC	0,070	0,064
Ácido benzoico	b	0,9880	0,9889
	R _C	0,9940	0,9944
	R _{VC}	0,9818	0,9892
	RMSEC	0,1548	0,1487
Ácido salicílico	b	0,9927	0,9956
	R _C	0,9963	0,9978
	R _{VC}	0,9939	0,9940
	RMSEC	0,1831	0,1416

b: pendiente

R_C: coeficiente de correlación de la calibraciónR_{VC}: coeficiente de correlación de la validación cruzada

RMSEC: raíz cuadrada del error de calibración (µg/mL)

III.3 Selección de las condiciones de destilación

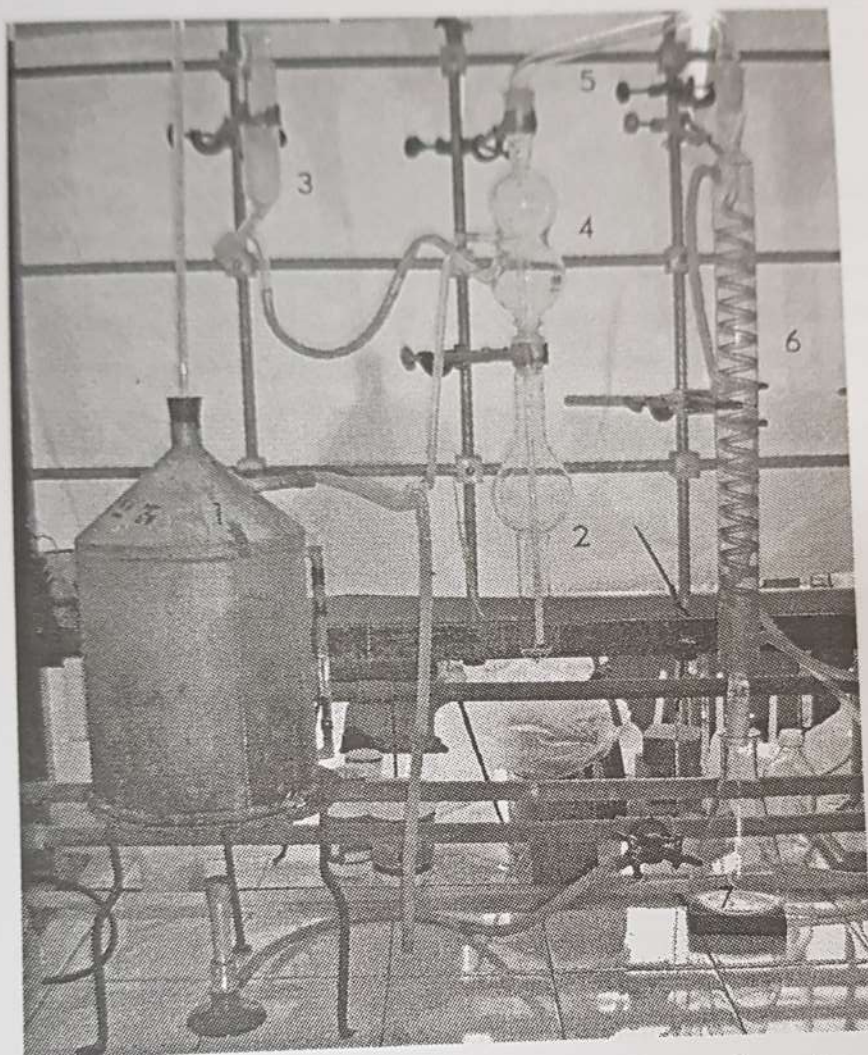
Se hicieron experiencias de destilación con distintos tipos de quesos con y sin adición estándar de conservadores (blanco de queso). En las mismas se trabajó con 2,5 g de queso, 10 mL de ácido sulfúrico 2,5 % v/v y las sales, que fueron agregadas según el diseño de las experiencias. El empleo de las sales se realizó a tres niveles; ausencia, 150 g de MgSO₄ y 70 g de NaCl, cantidades utilizadas para tratar de mantener la saturación de la solución durante el proceso de destilación. Cuando se trabajó con adición estándar se agregó al balón de destilación un volumen de cada solución patrón equivalente a 5 mg de cada uno de los conservadores. Se procedió a la destilación y a la lectura espectrofotométrica del destilado y se calculó la recuperación para distintos volúmenes de destilado, 250 y 500 mL, que se obtuvieron en 15 y 30 minutos respectivamente. En este caso fue necesario realizar diluciones de los mismos de manera de trabajar en el rango de concentraciones empleado en la etapa de calibración. Los porcentajes de recuperación calculados con el modelo 2 para las distintas condiciones ensayadas se observan en la Tabla 2.

TABLA 2.
Porcentajes de recuperación obtenidos por destilación
y espectroscopía UV del destilado

Conservador	Volumen de destilado					
	250 mL			500 mL		
	Utilización de sales					
	Nivel 1: sin sal	Nivel 2: con NaCl	Nivel 3: con MgSO ₄	Nivel 1: sin sal	Nivel 2: con NaCl	Nivel 3: con MgSO ₄
Ácido benzoico	66,5	94,6	90,5	84,0	98,0	95,7
	62,0	99,7	86,8	83,9	100,3	93,9
	65,1	102,4	92,2	87,2	101,4	99,6
Ácido salicílico	25,4	79,2	47,6	31,3	94,6	63,5
	30,7	80,5	49,5	46,3	92,1	60,7
	32,1	82,8	51,3	47,6	90,7	61,8
Ácido sórbico	83,2	98,1	95,4	90,6	98,8	96,2
	83,4	97,8	96,1	90,7	99,7	97,4
	84,2	97,6	94,7	92,0	99,5	97,6

Los resultados se analizaron estadísticamente con análisis de variancia para cada compuesto y se concluyó que influye el volumen de destilado y el tiempo de destilación, así como el empleo y tipo de sales. Los mayores porcentajes de recuperación se obtuvieron con la adición de sales para ambos volúmenes de destilación ensayados. Si se comparan los resultados obtenidos para las sales utilizadas, se observa que los porcentajes con MgSO₄ fueron inferiores que los obtenidos con NaCl para los ácidos sórbico y benzoico, y aun más para el ácido salicílico. Esto se debe a que con MgSO₄ la solución de destilación no siempre se mantuvo saturada durante el transcurso de la destilación por causa del agua de condensación, lo que influyó especialmente en la volatilidad del ácido salicílico. Para mejorar el rendimiento de la destilación se debería emplear mayor cantidad de MgSO₄. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados satisfactorios logrados con la sal NaCl, la que, además, se utiliza en menor cantidad (menor costo y mayor simplicidad del análisis), se seleccionó la misma para lograr una buena recuperación del ácido salicílico debido a que es el más difícil de destilar y podría no detectarse si las condiciones de destilación no fueran las adecuadas.

Figura 1.
Equipo de destilación por inyección de vapor



1: generador de vapor, 2: balón de destilación, 3: ampolla opcional para la adición de ácido sulfúrico, 4: trampas, 5: tubo conector, 6: condensador en espiral (50 cm de longitud), 7: colector de 500 mL de capacidad

III.3 Técnica de análisis

Etapa de destilación: se colocan en el balón de destilación aprox. $2,5 \pm 0,1$ g de queso, 10 mL de ácido sulfúrico 2,5 % v/v que se adicionan desde la ampolla reservorio (Figura 1), 70 g de NaCl y se procede a la destilación hasta recolectar cerca de 500 mL de destilado en 30 min. Se lleva a volumen en matraz aforado de 500 mL, se homogeneiza y se filtra con papel si es necesario.

Análisis espectrométrico: se realiza la lectura UV del filtrado a las longitudes de onda correspondientes al modelo utilizado y se calculan los $\mu\text{g/mL}$ de los ácidos sórbico, benzoico y salicílico con la función matemática obtenida en la calibración correspondiente. Paralelamente se deben realizar ensayos de destilación con los reactivos empleados (blanco de reactivos).

Los resultados se expresan en ppm para cada uno de los ácidos, según la siguiente ecuación:

$$C \text{ (ppm)} = \frac{C \text{ (}\mu\text{g/mL)} \times 500 \text{ mL}}{\text{Peso de muestra (2,5 g)}}$$

IV. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló una técnica separativa eficiente de destilación para el análisis de los ácidos sórbico, benzoico y salicílico. La misma se utilizó junto con la espectrometría UV y las técnicas estadísticas de RLS o RLM, lográndose una metodología sencilla y rápida que puede ser implementada como técnica de rutina en el análisis de quesos. De las dos técnicas estadísticas propuestas, la RLS está limitada en su aplicación ya que sólo la puede implementar una industria que tiene conocimiento de que sólo adiciona a sus quesos ácido sórbico como conservador, y debe cuantificarlo para determinar que su concentración no sólo sea efectiva sino que se encuentre dentro de los límites legales. La lectura UV a las otras longitudes de onda utilizadas en la RLM, además de la empleada en RLS permite, no sólo cuantificar el ácido sórbico sino también detectar la presencia y cuantificar los otros dos compuestos adulterantes.

Por otra parte, la técnica de destilación optimizada puede utilizarse como metodología de separación alternativa a la extracción por solventes utilizada en técnicas cromatográficas o colorimétricas para la cuali o cuantificación de estos conservadores (10).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kucukcetin, A.; Sik, B.; Cicek, A. y Certel, M. (2004). Determination of sodium benzoate and potassium sorbate in yoghurt and white pickled cheese by HPLC. *Milchwissenschaft*, 59 (7/8), 420-422.
- (2) Tfouni, S. y Toledo, M. (2002). Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian foods. *Food Control* 13, 117-123.
- (3) International Dairy Federation. Norma 139: 1987.
- (4) Perotti, M. C.; Benvenuto, M. A. y Bernal, S. M. Determinación simultánea de conservadores en alimentos por espectroscopia UV y cromatografía de gases. VI Encuentro Bromatológico Latinoamericano, Córdoba, 26 y 27 de setiembre de 2002.
- (5) Hair, J. E., Anderson R. E., Tatham, R. L. y Black, W. C. Análisis multivariante. Capítulo 4. Análisis de regresión múltiple. Prentice Hall Iberia SRL, 5ta. edición, 1999.
- (6) Thomas, E. V. (1994). A primer on multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, 66 (15), 795-804.
- (7) Piggott, J. Statistical procedures in food research. Elsevier Applied Science Publ. Ltd., United Kingdom, 1986.
- (8) Myers, R. Classical and modern regression with applications. Chapter 3: The multiple linear regression model. Duxbury Press, Boston, 1986.
- (9) Instituto Argentino de racionalización de Materiales (IRAM). Norma 15 717.
- (10) Official Methods of Analysis (AOAC). Normas 960. 38, 967.15 y 975.30.
- (11) Perotti, M. C. Evaluación del grado de lipólisis en quesos argentinos duros y madurados con hongos. Tesis Magister en Ciencia de los Alimentos. Programa de Lactología Industrial (PROLAIN). Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, 1999.
- (12) Noller, C. R. Química de los compuestos orgánicos. López Libreros Editores SRL, Buenos Aires, 1968.