

Estudio de la estabilidad del ácido sórbico en un alimento a base de pollo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Nancy Salinas e Ysmel La Rosa*

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo,
Valencia, Venezuela.*

Recibido: 22-07-2000 Aceptado: 15-02-2001

Resumen

Un alimento basado en carne de pollo fue preparado aplicando la tecnología de obstáculos a través de la técnica de infusión húmeda utilizando como humectantes: sacarosa, cloruro de sodio, glicerina, ácido acético y sorbato de potasio. El alimento fue almacenado por 50 días bajo condición de temperatura controlada a 23, 30, 37 y 40°C. Durante el almacenamiento del producto se analizó pH, actividad de agua, estado microbiológico y contenido de ácido sórbico por HPLC; encontrando que el pH fue 4,75 sin variación significativa. La actividad de agua disminuyó significativamente. No se encontró crecimiento de microorganismos. Se observó que ocurre una disminución significativa del sorbato de potasio con respecto al tiempo y la temperatura de almacenamiento del alimento, la cual sigue una cinética de pseudo 1° orden con una constante de velocidad de 0,0113, 0,0134, 0,0161, 0,018 días⁻¹ a las temperaturas de almacenamiento de 23, 30, 37, y 40°C respectivamente; y una energía de activación igual a 4748,59 cal/mol.

Palabras clave: Ácido sórbico; cromatografía líquida.

Study of Sorbic Acid Stability in a Chicken Food by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Abstract

A food based on chicken meat was prepared applying the technology of obstacles through the technique of humid infusion using as humectants: sucrose, sodium chloride, glycerine, acetic acid and potassium sorbate. The food was stored for 50 days under condition of controlled temperature at 23, 30, 37 and 40 °C. During the storage time the pH, water activity, microbiological status and content of sorbic acid by HPLC were analyzed, finding that the pH was 4,75, not presenting significant variation. The water activity diminishes significantly. The food product didn't present growth of microorganisms. A decrease of the potassium sorbate with regard to the time and to the temperature of storage of the food was observed, following a kinetic of pseudo 1° order, with a constant of 0,0113; 0,0134; 0,0161; 0,018 days⁻¹ at 23, 30, 37 and 40°C respectively; and an energy activation equal to 4748,59 cal/mol.

Key words: Liquid chromatography; sorbic acid.

* Autor para la correspondencia. Fax: 041-678805. E-mail: nsalinas@thor.uc.edu.ve

Introducción

Hoy en día la incorporación de sustancias preservativas que permitan conservar los alimentos libres de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) constituye un factor de especial interés para la Industria Alimentaria. Una de las sustancias preservativas más usadas debido a su gran eficiencia e inocuidad, es el ácido sórbico. Este fungiestático es incorporado en una gran variedad de productos alimenticios, en este caso en particular, el mismo fue incorporado como su sal potásica en un alimento de humedad intermedia a base de pollo, el cual es un producto diseñado para ser consumido en situaciones especiales de campaña (1).

En estudios anteriores (1-3) este alimento resultó ser estable microbiológicamente por un período de tres meses, sin embargo, sabiendo que la eficiencia del preservativo está determinada por su cantidad activa presente en el alimento, y que de acuerdo a estudios previos dicho ácido es inestable y se degrada en matrices alimenticias por vía oxidativa, surge la inquietud de estudiar la estabilidad del ácido sórbico en este producto, así como evaluar ciertos parámetros fisicoquímicos del producto alimenticio.

Materiales y Métodos

El seguimiento de la degradación del preservativo fue llevado a cabo periódicamente por técnica de extracción con metanol, seguida por una cromatografía líquida de alta resolución (4). Al mismo tiempo al producto se le realizaron mediciones de pH, actividad de agua, y estudios de su calidad microbiológica.

Preparación y empaque de las muestras

La elaboración del producto alimenticio se llevó a cabo según el proceso de infusión húmeda, de acuerdo a la formulación ya establecida (1). Una vez elaborado el alimento este fue empacado en bolsas de polipropileno (PP), selladas térmicamente, colo-

cadadas en cajas de cartón, y almacenadas por un lapso de 2 meses bajo temperatura controlada (23, 30, 37 y 40°C)

Análisis de ácido sórbico

Preparación de estándar interno (E.I) (1000 ppm): Se disolvió 100 mg de ácido benzoico en 200 mL de Metanol, y se diluyó a 1000 mL con agua bidestilada.

Preparación de estándar externo (E.E) (500 ppm): Solución madre: se disolvió 125 mg de ácido sórbico en 50 mL de Metanol, y se diluyó a 250 mL con agua bidestilada. Soluciones de trabajo: se adicionó 15 mL de E.I., y alícuotas de solución madre de E.E., y se diluyó a 50 mL con agua bidestilada, con la que se prepararon soluciones que contienen 250, 100 y 50 ppm. (5).

Condiciones cromatográficas: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC), marca Hewlett Packard (HP) modelo 1050, acoplado a un detector UV. Columna C18, marca Nucleosil, con una longitud de: 12,5 cm, un diámetro interno: 4 mm y un tamaño de partícula: 5 µm. Condiciones de operación: Fase móvil, Metanol y Buffer fosfato (pH=4.5) en una proporción 40:60. Velocidad de flujo: 0,8 mL/min. Volumen de inyección de 10 µL, Longitud de onda de detección: 235 nm, Temperatura ambiente (5-8).

Extracción del ácido sórbico: Se pesaron 1,5-2,0 g de muestra homogeneizada, colocándose en un tubo de ensayo con tapa, donde se le añadió 2 mL de HCl (alcohólico) al 10%; 3 mL del estándar interno, y 5 mL de metanol (9); agitándose en un vortex hasta suspender toda la muestra, y posteriormente se colocó en un baño ultrasónico por 15 minutos. Se tomó una alícuota de 2 mL del sobrenadante, y se filtró a través de filtro microporo (0,45 µm). El extracto alcohólico fue inyectado al HPLC, usando las condiciones previamente descritas.

Medición de pH

Se procedió a medir el intervalo de acidez a una porción de la muestra homogenei-

zada, para lo cual se empleó un pHmetro Cornig 320, previamente calibrado.

Medición de la actividad de agua (a_w)

Se realizaron tres mediciones de actividad de agua empleando para ello un equipo psicométrico (Decagon Devices, Inc. Pullman, WA) Aqualab, modelo CX2.

Análisis microbiológico

Esta evaluación se realizó a través de un recuento total en placa de aerobios mesófilos; de mohos y levaduras, utilizando medio de recuento estándar y agar papa dextrosa respectivamente, por medio de la técnica de siembra en profundidad, bajo campana de flujo laminar.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de las mediciones de pH, actividad de agua y concentración de ácido sórbico, se sometieron a un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) con un límite de confianza igual a un 95%.

Resultados y Discusión

Medición del pH del alimento a base de pollo

Se demostró que no existe diferencia significativa entre los valores de pH tomados, durante el tiempo de almacenamiento, ni entre las muestras almacenadas a diferentes temperaturas; lo que indica que el pH del alimento permanece invariable ($4,471 \pm 0,007$) a pesar de las condiciones de tiempo y temperatura a las que fueron sometidas las muestras alimenticias.

Medición de la actividad de agua (a_w) del producto alimenticio

La actividad de agua del producto disminuyó de 0,850 a 0,820; 0,749; 0,658 y 0,447 a las temperaturas de 23, 30, 37 y 40°C respectivamente. El estudio estadístico indicó que existe variación significativa

de la actividad de agua del alimento durante el tiempo de almacenamiento de cada una de las muestras; así como también existe significancia entre las muestras almacenadas a diferentes temperaturas; esta diferencia se encuentra específicamente entre las muestras almacenadas a 23 y 40°C, y a 23 y 37°C. Esto es debido a que el material de empaque empleado (PP) es permeable al agua, ocurriendo una difusión de las moléculas del agua desde el interior del empaque hacia el exterior. También se debe tomar en cuenta que al producirse un aumento de la temperatura aumenta la presión del vapor de agua dentro del empaque, lo que puede promover el escape de dicho vapor desde el interior del empaque hacia el exterior. El incremento en la temperatura actúa igualmente sobre el empaque provocando un alejamiento entre las cadenas del polímero que lo constituye, facilitando de esta manera el fenómeno de disminución de la actividad de agua del producto alimenticio.

Estudio del estado microbiológico del alimento a base de pollo

El producto alimenticio bajo todas las condiciones de almacenamiento no presentó crecimiento de aerobios mesófilos, ni de mohos y levaduras, microorganismos que generalmente crecen en productos a base de pollo (10), por lo que se cumplió con buenas prácticas de manufactura. Esta protección es debida principalmente a que la cantidad de ácido sórbico incorporada en el producto alimenticio, así como las otras barreras contra el crecimiento microbiano (pH, a_w), aplicadas gracias a la tecnología de obstáculos (empleada en su preparación) (11).

Estudio de la estabilidad del ácido sórbico

Degradación del ácido sórbico: Se observa en el Figura 1, una disminución de la concentración del ácido sórbico a lo largo del tiempo. Esto concuerda con las observaciones realizadas por Arya (2), según la cual

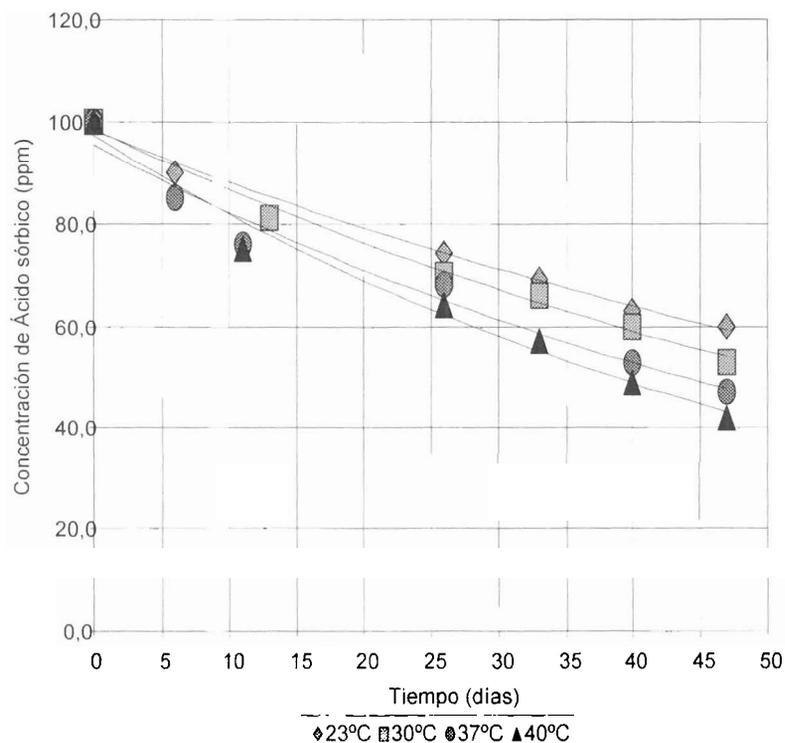


Figura 1. Degradación del ácido sórbico en el producto durante el almacenamiento.

este ácido se degrada tanto en soluciones como en matrices alimenticias mediante autoxidación. Las concentraciones remanentes de ácido sórbico en la matriz alimenticia estudiada fueron de 60, 53, 47 y 43 ppm, dicha degradación corresponde a una cinética de pseudo 1° Orden, encontrando que las constantes de velocidad aparente son 0,0113, 0,0134, 0,0161, 0,018 días⁻¹, a las temperaturas de 23, 30, 37 y 40°C respectivamente, tal como se observa en el Figura 2. Esta degradación del ácido sórbico en el producto, presenta una variación significativa ($\alpha = 0.05$) cuando ocurre un incremento de la temperatura de almacenamiento de por lo menos 10°C, específicamente entre 23 y 37°C, 23 y 40°C y entre 30 y 40°C.

La degradación del ácido sórbico puede deberse a una serie de factores, entre los cuales se tiene:

a) Auto-oxidación del ácido sórbico. Debido a la presencia del oxígeno dentro del

empaquete, así como en la atmósfera circundante del alimento, facilitando la adición de oxígeno en los dobles enlaces del ácido entre sus átomos de carbono 4 y 5, originando de ésta manera productos como, malondialdehído, 2-butenal y propenal (3).

b) Oscurecimiento no enzimático. Un hecho que probablemente favorece la degradación del sórbico es la presencia de un oscurecimiento en las muestras provocada por una reacción de Maillard (12) debido a que el ácido sórbico oxidado presenta grupos carbonilos potencialmente reductores, los cuales pueden intervenir en dicha reacción de oscurecimiento, provocando una perturbación estado de equilibrio según el principio de Le Chatelier, lo que a su vez se traduce en un aumento de la velocidad global de la degradación del sórbico (13).

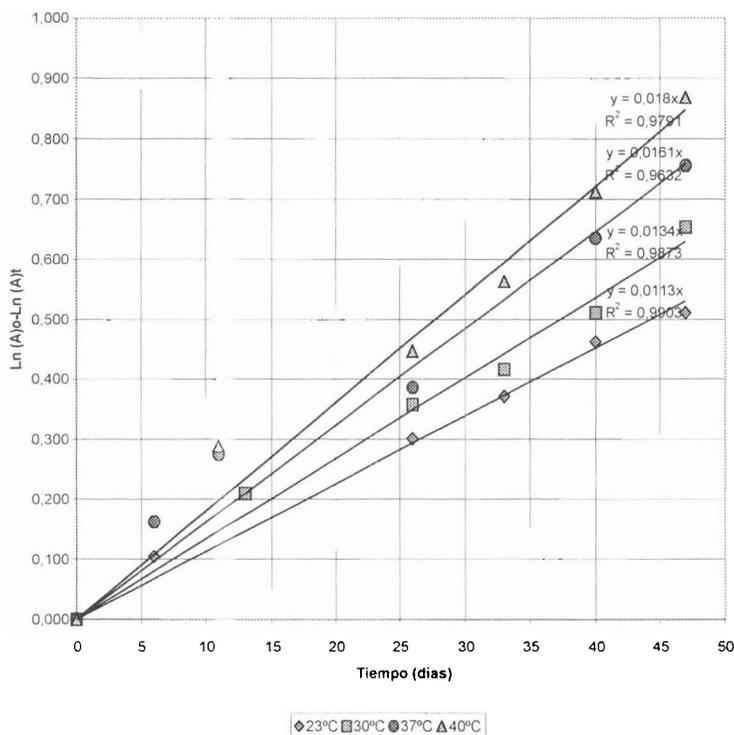


Figura 2. Demostración de la degradación de pseudo 1º Orden del ácido sórbico en el producto.

- c) **Temperatura.** Igualmente en este estudio se observó el efecto de la temperatura sobre dicha degradación, según el cual a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento del producto alimenticio se aprecia un incremento de la velocidad aparente de la degradación. En este caso se considera que la temperatura puede intervenir de diferentes maneras en el proceso de degradación del ácido sórbico. En primer lugar se debe tomar en cuenta que el aumento de la temperatura produciría un mayor número de encuentros energéticamente favorables, es decir un incremento de la probabilidad de choques efectivos, lo que podría aumentar la velocidad de la degradación directa o indirectamente, ya que este fenómeno no sólo puede ocurrir sobre la reacción de oxidación del sórbico, sino también sobre la velocidad de la reacción de oscurecimiento no enzimático (2, 14).
- d) **Tipo de empaque.** El material empleado es un polímero (específicamente poli-propileno) permeable al oxígeno ($2000 \text{ cm}^3/24\text{h}/\text{m}^2/25\text{micras}$ a condiciones normales de presión y temperatura), razón por la cual se presume que la concentración de oxígeno dentro del empaque no es un factor limitante de la reacción de oxidación del ácido sórbico. Este material plástico es igualmente permeable a vapores orgánicos, por lo que se cree que puede ocurrir la migración de los productos de oxidación del ácido sórbico (específicamente el propenal) desde el interior hacia el exterior del empaque, provocando que se favorezca un desplazamiento de la reacción de oxidación. Por otra parte, en los empaques plásticos la permeabilidad a los gases aumenta a altas temperaturas, ya que ocurre un alejamiento de las cadenas del polímero a la vez de aumentar la solubilidad de los mismos en el material plástico, en este

caso, este hecho permite pensar que a altas temperaturas existe una mayor disponibilidad de oxígeno dentro del empaque, así como una mayor probabilidad a que el producto de la oxidación escape del empaque, hechos que contribuiría con la oxidación del ácido sórbico (15).

- e) Acidez de la matriz alimenticia. Particularmente los factores que determinan el pH del presente alimento son la presencia del ácido acético (en forma de vinagre comercial) y la pasta de tomate doble concentrada empleados en la formulación del mismo. En dicho alimento se encontró que el nivel de acidez es cercano al valor de pKa del ácido sórbico ($pK_a = 4,8$), razón por la cual la reacción de degradación del mismo se vería favorecida si se considera que las moléculas no disociadas del sórbico son las más susceptibles a la degradación por vía oxidativa en soluciones acuosas (2).

Estudio cinético de la degradación del ácido sórbico:

La degradación del sórbico sigue una cinética de pseudo primer orden. Este hecho se ajusta a resultados encontrados en estudios cinéticos de la degradación de dicho ácido en otras matrices alimenticias (13,14,16), obteniéndose una constante de velocidad aparente de 0,0113; 0,0134; 0,0161 y 0,0180 días⁻¹ a 23, 30, 37 y 40°C respectivamente. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del sórbico fue de 61,34 días; 51,73 días; 43,05 días; 38,51 días, a 23, 30, 37, y 40°C, respectivamente.

Como se aprecia en el Figura 3, la degradación del ácido sórbico cumple con la Ley de Arrhenius, es decir que la velocidad de degradación del ácido sórbico en el producto depende de la temperatura de almacenamiento, ya que el comportamiento es lineal ($R^2 = 0,992$), y está descrito por la ecuación $y = -2391,2x + 3,5898$; mediante la cual se logró conocer que la energía de activación (E_a) es igual a 4748,59 cal/mol y que el factor de frecuencia (A) es 36,23 día⁻¹.

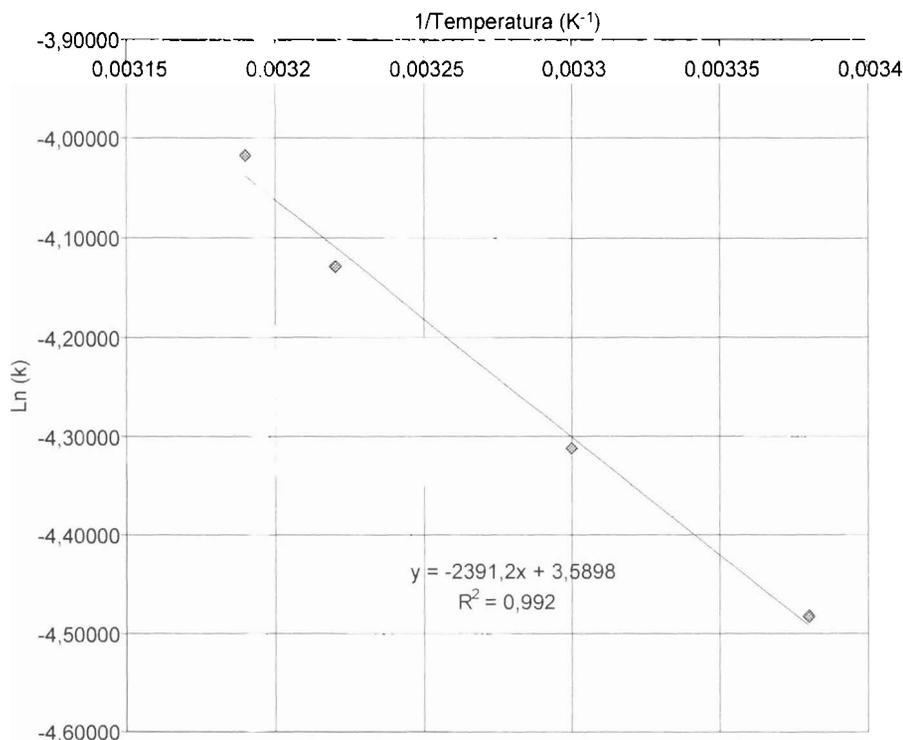


Figura 3. Comprobación de la Ley de Arrhenius en la degradación del ácido sórbico en el producto.

Conclusiones

El ácido sórbico se degrada en el producto, siguiendo una cinética de pseudo primer orden, manteniendo su estabilidad microbiológica durante el período en estudio. El método utilizando extracción así como el posterior análisis por HPLC, resultó una técnica simple, rápida y reproducible para la determinación de sorbatos en productos alimenticios.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Departamento de Química de la FACYT-UC, y al CDCHT-UC a través del proyecto #2000-003, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Referencias Bibliográficas

1. SALINAS N. Desarrollo y Elaboración de un Alimento de Humedad Intermedia de Origen Cárnico para Uso Militar (M.Sc.Tesis), Universidad Simón Bolívar, Sartenejas (Venezuela), p 59-62, 1995.
2. ARYA S. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 28: 1246-1249, 1980.
3. VIDYASAGARK., ARYA S. *Journal of Food Technology* 19:447-454, 1984.
4. DE VILLIERS M. M., BERGH J. *Journal of Drug Dev Ind Pharm* 26(5):539-547, 2000.
5. BUI L., COOPER C. *Journal of the A.O.A.C.* 70:892-896, 1987.
6. DONG M. W., DICESARE J. L. *Food Technology*, 1983.
7. SAITO I., OSHIMA H., KAWAMURA N., UNO K., YAMADA M. *Journal of the A.O.A.C.* 70:507-509, 1987.
8. OLIVO DE ACOSTA E. Aplicaciones de la Cromatografía de Gases y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en el Análisis de Alimentos. *II Curso Internacional "Aspectos Normativos y Metodológicos del Registro y Control de Alimentos"*. Caracas (Venezuela), 1996.
9. OI-WAH, SHIU-FAI LUK. *Analyst* 112:1269-1272, 1987.
10. FENNEMA O. R. *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*, Editorial Reverté S.A., Barcelona (España), pp. 609-620, 1985.
11. HERNÁNDEZ R., TOMÉ E. KODAIRA M Effect of Potassium Sorbate on Physical, Chemical and Microbiological Characteristics of Smoked Sardine (*Sardinella aurita*) Stored at refrigerated Temperature. *Annual Meeting IFT* (USA), 1999.
12. O'BRIEN J., MORRISEY P. A. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (28):211-245, 1989.
13. CAMPOS C., ALZAMORA S., GERSCHENSON L. *Meat Science* 41(1):37-46, 1995.
14. GERSCHENSON L., ALZAMORA S., CHIRIFE J. *Journal of Food Science* 51:1028-1031, 1986.
15. YÚFERA E. *Química Agrícola III, Alimentos*, Editorial Alhambra, S. A., Madrid (España), pp. 648-664, 1982.
16. CAMPOS C., GERSCHENSON L., ALZAMORA S., CHIRIFE J. *Journal of Food Science* 56:863-866, 1991.