

Tesis de Posgrado

Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos

Campos, Carmen Adriana

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Campos, Carmen Adriana. (1995). Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2705_Campos.pdf

Cita tipo Chicago:

Campos, Carmen Adriana. "Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2705_Campos.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

**Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación
y el almacenamiento de alimentos**

Carmen Adriana Campos

Tesis presentada para optar al
Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Directora de tesis: *Dra. Lía Noemí Gerschenson*

1995

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

**Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación
y el almacenamiento de alimentos**

Carmen Adriana Campos

**Tesis presentada para optar al
Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

Directora de tesis: *Dra. Lía Noemí Gerschenson*

Tesis

by

1995

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires, a la Secretaría de Ciencia y Tecnología (Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero brindado para la realización de esta tesis.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por facilitar el uso de sus instalaciones.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, quien dirigió este trabajo, por la dedicación, el estímulo, y la ayuda que siempre recibí.

A la Dra. Stella Maris Alzamora por su apoyo.

A las Dras. Sandra Guerrero, Pilar Buera y a la Bioqca. Ana María Rojas quienes, en forma desinteresada, me asesoraron para el tratamiento de algunos temas de este trabajo.

A la Dras. Liliana Mauri, Mariela Carnino y al Sr. Juan Muess por su asesoramiento en el manejo del cromatógrafo.

A Ada Albertoni quien colaboró en las búsquedas bibliográficas realizadas.

A todos mis compañeros del Departamento de Industrias, y particularmente a Susana Vidales, quienes me ayudaron y acompañaron durante todo este tiempo.

A Merck Química Argentina, que proveyó parte de los reactivos utilizados en esta tesis.

A mi familia, por su apoyo y comprensión.

Carmen Adriana Campos

A mis padres
A Ramón y a Marcelo

INDICE GENERAL

- 1 - INTRODUCCION, p. 1
- 2 - OBJETIVOS, p. 54
- 3 - PUESTA A PUNTO DE LOS METODOS DE DOSAJE DE ACIDO SORBICO, p. 56
- 4 - ESTABILIDAD DEL ACIDO SORBICO EN SISTEMAS MODELO ACUOSOS, p. 90
- 5 - ESTABILIDAD DEL ACIDO SORBICO EN HOMOGENATOS CARNICOS, p. 242
- 6 - CONCLUSIONES GENERALES, p. 281
- 7 - TABLAS DE DATOS, p. 282
- 8 - APENDICE: PREDICCION DE LA ACTIVIDAD DE AGUA, p. 309
- 9 - APENDICE: PROCEDIMIENTOS ESTADISTICOS, p.312
- 10 - BIBLIOGRAFIA, p. 335

1 - INTRODUCCION

1.1 - Preservación de alimentos, p. 2

- 1.1.1 Actividad de agua, p. 2
- 1.1.1.1 Estabilidad microbiológica, p. 4
- 1.1.2 Preservación de alimentos por depresión de la actividad de agua, p. 7
- 1.1.3 - Preservación de alimentos por métodos combinados, p. 8

1.2 - Acido sórbico - generalidades, p. 11

- 1.2.1 Obtención del ácido sórbico, p. 12
- 1.2.1.1 Obtención de sales alcalinas, p. 15
- 1.2.2 Propiedades del ácido sórbico, p. 15
- 1.2.2.1 Propiedades físico-químicas, p. 15
- 1.2.2.1.1 Solubilidad y partición, p. 16
- 1.2.2.2 Reacciones en que participa el ácido sórbico, p. 21
- 1.2.3 Degradación del ácido sórbico, p. 28
- 1.2.3.1 Degradación oxidativa del ácido sórbico, p. 28
- 1.2.3.1.1 Cinética de degradación, p. 28
- 1.2.3.1.2 Factores que afectan la destrucción, p. 29
- 1.2.3.2 Degradación radiolítica del ácido sórbico, p. 31
- 1.2.3.2.1 Factores que afectan la degradación radiolítica del ácido sórbico, p. 32
- 1.2.3.3 Degradación del ácido sórbico por acción de microorganismos, p. 34
- 1.2.4 Acción antimicrobiana, p. 37
- 1.2.4.1 Factores que afectan la acción antimicrobiana de los sorbatos, p. 42
- 1.2.5 Aplicaciones de los sorbatos, p. 46
- 1.2.5.1 Aplicaciones de los sorbatos, con especial referencia a productos cárnicos, p. 46
- 1.2.5.2 Aplicaciones en productos farmacéuticos y cosméticos, p. 48
- 1.2.5.3 Aplicaciones en otras industrias, p. 48
- 1.2.5.4 Métodos de aplicación, p. 49
- 1.2.6 Toxicidad de los sorbatos, p. 49
- 1.2.6.1 Metabolismo de los sorbatos, p. 50
- 1.2.6.1 Reacciones alérgicas potenciales provocadas por los sorbatos, p. 52
- 1.2.6.3 Potencial mutagénico de las interacciones sorbatos-nitrito, p. 52
- 1.2.6.4 Efecto de los sorbatos sobre la formación de nitrosaminas, p. 52

1 - INTRODUCCION

1.1 - Preservación de alimentos

Los procesos de preservación de alimentos tienen como objetivo prolongar la vida útil de los mismos a fin de permitir su almacenamiento y distribución. También deben asegurar sus características organolépticas y su valor nutritivo que depende, entre otros factores, de las operaciones a las que se someten las materias primas durante su procesamiento y de las condiciones de almacenamiento, tanto de las materias primas como del producto final. Para definir la calidad de un alimento se deben tomar en cuenta tres aspectos: el higiénico-sanitario, ya que debe ser inocuo para la salud; el nutritivo, relacionado a la presencia de nutrientes y antinutrientes en el mismo y la aceptabilidad del producto, la cual está vinculada a la percepción psicosensores (Tannenbaum, 1982).

El objetivo primario de un proceso de preservación es, desde luego, lograr la estabilidad microbiológica del alimento, ya que ella está directamente relacionada con la salud humana. Una vez logrado este objetivo, se debe considerar el desarrollo de reacciones adversas que puedan ocurrir, tanto durante las operaciones de acondicionamiento de la materia prima, como en el procesamiento y almacenamiento.

Lograr la prolongación de la vida útil de un alimento involucra en muchos métodos de preservación, disminuir el contenido de agua del mismo (ya sea por evaporación, como en el secado o la concentración; por sublimación, como en la liofilización; por inmovilización, como en la congelación; por aumento de la concentración de solutos en la fase acuosa del alimento, como en el salado, etc.)

Se ha demostrado que la mejor expresión de la disponibilidad del agua para el crecimiento de los microorganismos y la ocurrencia de otras reacciones de deterioro en alimentos es el parámetro de actividad de agua, a_w . A continuación se analizará el concepto de actividad de agua y su relación con la estabilidad microbiológica del alimento para luego describir los métodos de preservación basados en la depresión de la actividad de agua por la adición de solutos.

1.1.1 - Actividad de agua

En un sistema líquido-vapor formado por un solo componente, la tendencia de escape de las moléculas se mide en términos de la energía libre de Gibbs (G). En un sistema de varios componentes, la

tendencia de escape del solvente (componente 1) está dada por su potencial químico, μ_1 .

$$\mu_1 = \left. \frac{\delta G}{\delta n_1} \right]_{T, P, n_2, \dots, n_i} \quad (1.1)$$

donde n_i = número de moles de la especie i .

El potencial químico del solvente, agua en este caso, está dado por:

$$\mu_1 = R.T \ln f_1 + A_1 \quad (1.2)$$

siendo f_1 la fugacidad y A_1 , una constante que depende de la temperatura.

Para un cambio de concentración de agua a una dada temperatura:

$$\mu_1 - \mu'_1 = RT \ln (f_1 / f'_1) \quad (1.3)$$

donde μ'_1 y f'_1 son, respectivamente, el potencial químico y la fugacidad del nuevo estado.

El concepto de actividad de agua (a_w) se define como la relación, a una dada temperatura, de la fugacidad de una sustancia en un dado estado (f) y su fugacidad en un estado estándar (f_0) en el cual $a_w^0 = 1$ (Lewis y Randall, 1961).

Si se refiere la ecuación (1.3) al estado estándar:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = RT \ln a_w \quad (1.4)$$

Eligiendo como estado estándar el agua pura a presión atmosférica, la actividad de agua en cualquier solución es:

$$a_w = f_1 / f_1^{\text{agua pura}} \quad (1.5)$$

En soluciones acuosas y en particular en alimentos, a temperatura y presión normales, la diferencia entre la fugacidad y la presión de vapor es despreciable, con lo cual se puede aproximar:

$$f_i = p_i \quad (1.6)$$

En base a esto se puede emplear la siguiente definición operativa de la actividad de agua:

$$a_w = p_i / p_i^{\text{agua pura}} \quad (1.7)$$

donde: p_i es la presión de vapor de agua en la solución.

$p_i^{\text{agua pura}}$ es la presión de vapor del agua pura.

La expresión (1.7) puede relacionarse con la humedad relativa en equilibrio con el alimento (HRE %) por la siguiente ecuación:

$$a_w = \text{HRE \%} / 100 \quad (1.8)$$

1.1.1.1 - Estabilidad microbiológica

La actividad de agua es una medida de la disponibilidad del agua necesaria para el crecimiento y desarrollo de las funciones metabólicas de los microorganismos.

Scott (1957) resumió las relaciones entre el crecimiento de los microorganismos y la actividad de agua estableciendo lo siguiente:

* La actividad de agua determina el límite mínimo de disponibilidad de agua para el crecimiento de los microorganismos. El valor de a_w límite por debajo del cual un dado microorganismo no puede crecer, considerando los demás factores que afectan al desarrollo en sus niveles óptimos (temperatura, pH, oxígeno, nutrientes, agentes antimicrobianos, etc.), se conoce como a_w mínima. En la Tabla 1.1 se muestran los valores de a_w mínima para el crecimiento y la producción de toxinas de microorganismos típicos de alteraciones en alimentos (Beuchat, 1987).

* Existe una cierta adaptación de algunos microorganismos a crecer a bajas actividades de agua.

* Cuando la actividad de agua se reduce por el agregado de solutos, estos pueden producir efectos específicos, los cuales modifican el efecto propio de la actividad de agua. En la Tabla 1.2 se muestra la influencia de distintos solutos sobre la a_w mínima de crecimiento de bacterias (Sperber, 1983).

Tabla 1.1: Valores de a_w mínima para el crecimiento y producción de toxinas de microorganismos típicos de alteraciones en alimentos (Beuchat, 1987).

Microorganismo	Mínima a_w para crecimiento - producción de toxina		Referencia
Bacterias			
<i>Clostridium</i>	0,93	---	(tipo A) Baird Parker (1967)
<i>botulinum</i>	0,95	---	(tipo A) Ohye y Christian (1967)
	0,94	0,94	(tipo B) Ohye y Christian (1967)
	0,97	0,97	(tipo E) Ohye y Christian (1967)
	0,965	0,965	(tipo E) Briozzo y col. (1986)
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	0,95		Kang y col. (1969)
<i>Bacillus</i>	0,95		Scott (1957)
<i>cereus</i>	0,93		Jakobsen y col. (1972)
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	0,86	0,87 (enterotox. A)	Scott (1957) Troller (1972)
		0,96 (enterotox. B)	Troller (1972)
Hongos			
<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	0,80	0,83-0,87 (aflatoxina)	Northolt y col. (1977)
<i>Aspergillus</i> <i>ochraceus</i>	0,83	0,83-0,87 (Ocratoxina)	Northolt y col. (1977)
<i>Penicillium</i> <i>expansum</i>	0,83-0,85	0,99	Northolt y col. (1977)
<i>Trichothecium</i> <i>roseum</i>	0,90	---	(trichotecina) Pelhate (1968)

Tabla 1.2: Influencia del soluto sobre la actividad de agua mínima de crecimiento de bacterias (Sperber, 1983).

Microorganismo	Mínima a_w de crecimiento en		
	NaCl	glucosa	glicerol
<i>Clostridium perfringens</i>	0,970	0,960	0,950
<i>Clostridium botulinum</i> E	0,970	—	0,940
<i>Clostridium sporogenes</i>	0,945	0,965	0,935
<i>Lactobacillus helveticus</i>	0,963	0,966	0,928
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,985	0,986	0,947
<i>Streptococcus lactis</i>	0,965	0,949	0,924
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,957	—	0,940

Cuando la actividad de agua del medio se reduce por debajo de su valor óptimo, la curva de crecimiento del microorganismo varía. En general, se observa que aumenta la extensión de la fase de latencia (lag), disminuye la pendiente de la fase exponencial y el recuento de microorganismos en la fase estacionaria.

Cuando un microorganismo se encuentra en un medio de actividad de agua reducida se produce una deshidratación osmótica cuya magnitud es directamente proporcional a la diferencia entre la actividad de agua intra y extracelular. Como resultado de la deshidratación de la célula, se detiene el crecimiento. Sin embargo, los procesos metabólicos continúan, produciéndose una serie de reacciones de osmoregulación que conducen a la síntesis de solutos compatibles (no interfieren con la actividad enzimática de la célula) de forma tal que se logra la rehidratación de la célula y ésta puede continuar su crecimiento.

El mecanismo de osmoregulación celular, en el caso de una reducción de la actividad de agua externa, funciona para mantener la homeostasis con respecto al contenido de agua (Gould y col., 1983). Este proceso de síntesis implica un consumo de energía considerable, disminuyendo en consecuencia la velocidad de crecimiento debido a que la energía disponible para la síntesis celular es menor; este fenómeno explica la menor pendiente de la fase exponencial. Si la actividad de agua externa se reduce de forma tal de sobrepasar la capacidad de osmoregulación celular, el crecimiento se inhibe.

1.1.2 - Preservación de alimentos por depresión de la actividad de agua

La necesidad de contar con alimentos procesados, nutritivos y estables durante su almacenamiento ha ido creciendo a la largo de este siglo. Por esta razón se produjo una rápida expansión de la industria de alimentos congelados; pero su éxito depende de una adecuada cadena de frío en la distribución. Este problema no lo presentan los alimentos deshidratados; no obstante, estos presentan otro tipo de inconvenientes, por ejemplo, la pobre recuperación de la textura luego de la rehidratación, el desarrollo de reacciones de deterioro durante el procesamiento y almacenamiento (pardeamiento no enzimático, oxidación de lípidos, etc.), la pérdida del grado de rehidratación y del valor nutritivo.

En las últimas décadas se ha centrado el interés en el desarrollo de alimentos mediante una disminución del agua disponible por adición de solutos, también llamados humectantes. Esta metodología dio lugar al desarrollo de los "alimentos de humedad intermedia" (AHI). Estos tienen una humedad en base seca del 20 - 50 %, lo que se traduce en valores de actividad de agua en el rango de 0,70 - 0,85. Inicialmente, esta tecnología fue empleada para la fabricación de alimentos para animales y para fines especiales como los destinados al ejército o viajes espaciales, ya que los mismos son estables a temperatura ambiente.

La elaboración de productos estables por la incorporación de solutos y/o la deshidratación parcial hasta los niveles de actividad de agua mencionados ha sido practicada en forma empírica desde hace siglos. Sin embargo, recién en los años sesenta se desarrolló la base científica de la formulación de alimentos de humedad intermedia. Entre los alimentos de humedad intermedia tradicionales se incluyen las frutas secadas al sol sin el agregado de humectantes (pasas de uva, ciruelas damascos, higos, etc.) los preservados por adición de azúcar (frutas confitadas, compotas, jaleas, almíbares), aquellos que han sido secados al sol con el agregado de azúcar y/o sal (pescados salados, embutidos crudos) y productos de panadería (tortas de frutas).

La cantidad de humectantes necesaria para reducir la actividad de agua a los niveles requeridos para asegurar la estabilidad microbiológica de los alimentos de humedad intermedia es alta (Chirife y col., 1980; Chirife y Ferro Fontán, 1980). Esto trae aparejado cambios en las características organolépticas que afectan negativamente el flavor y pueden provocar el rechazo por parte del consumidor. Además, pueden sufrir reacciones de deterioro tales como pardeamiento no enzimático, oxidación de lípidos, etc. que conllevan a la pérdida de palatabilidad. Por estas razones, el desarrollo de alimentos de humedad intermedia no ha tenido gran éxito (Troller y Christian, 1978).

Para evitar las desventajas antes mencionadas, se desarrolló un nuevo grupo de alimentos de mayor actividad de agua (0,90 - 0,95) que los alimentos de humedad intermedia, los "alimentos de alta humedad" (AAH) (Sperber, 1983). En estos, la estabilidad microbiológica se logra mediante una combinación de factores que obstaculizan el crecimiento microbiano o *hurdles* (Leistner y Rödel, 1975). Esta metodología de preservación se denomina métodos combinados.

1.1.3 - Preservación de alimentos por métodos combinados

En los alimentos preservados por métodos combinados la estabilidad microbiológica se logra por el uso de varios factores de

estrés, ninguno de los cuales sería letal para los microorganismos, si fuera usado individualmente con igual nivel. Estos alimentos, además de ser estables desde el punto de vista microbiológico, tienen buena palatabilidad (Leistner y col., 1981). El efecto de la combinación de los factores de estrés es fundamental, ya que controla además el deterioro químico y organoléptico.

El concepto de "obstáculo" aplicado en esta tecnología es la expresión del hecho que la estabilidad microbiológica se logra mediante complejas interacciones de numerosos factores de manera tal que combinados incrementan la demanda de energía y/o reducen su disponibilidad, no quedando ésta disponible para el crecimiento celular (Leistner, 1987). El siguiente cuadro ilustra este concepto (Gould y col., 1983):

Formas de interferencia de los factores adversos al desarrollo celular.

REDUCCION EN LA
DISPONIBILIDAD DE LA
ENERGIA

- * Exclusión del O₂
- * Limitación de nutrientes
- * Reducción de la temperatura

INCREMENTO EN LA
DEMANDA DE LA
ENERGIA

- * Reducción de la a_w
- * Reducción del pH
- * Adición de ácidos lipofílicos débiles y de otros compuestos activos en la membrana

Según Leistner (1985), los factores de inhibición del crecimiento microbiano, son hasta cierto punto intercambiables. Por ejemplo, para la conservación de la carne fresca se necesitan bajas temperaturas de almacenamiento lo cual implica un consumo de energía importante. Este factor de inhibición del crecimiento microbiano puede reemplazarse por otro de menor costo, por ejemplo, depresión de la actividad de agua y/o leve descenso de pH.

Otro factor muy usado en el diseño de alimentos preservados por esta tecnología, es la aplicación de un tratamiento térmico suave (70 - 110 °C), de manera tal que los microorganismos y, en especial, las esporas sufran un daño subletal y no puedan sobreponerse a la presencia de los demás factores de estrés presentes en el alimento.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que los factores de estrés pueden modificarse durante el almacenamiento, o bien actuar en una dada secuencia. Esto puede tener distintos efectos sobre la estabilidad del alimento, por ejemplo:

- * Algunos preservadores, como el sorbato de potasio o el bisulfito, pueden oxidarse o reaccionar con otros componentes del alimento disminuyendo su tenor a concentraciones no efectivas.

* En el caso de la maduración de embutidos, los factores de estrés (nitrito, pH, flora competitiva, potencial redox) actúan en una dada secuencia y durante cierto período de la maduración, para inhibir el crecimiento de bacterias indeseables (*Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, bacilos gram negativos y hongos que producen deterioro) y para permitir la selección de una flora competitiva adecuada (bacterias ácido lácticas). Por ejemplo, el nitrito de sodio actúa al comienzo de la maduración. Por lo tanto, aunque su concentración disminuya a lo largo del proceso, la acción conjunta de otros factores de estrés permite la conservación del producto. La secuencia de factores de inhibición se puede esquematizar de la siguiente manera (Leistner, 1985):

nitrito —> potencial redox —> flora competitiva —> pH —>
 a_w —> preservadores

El nitrito inhibe a *Salmonella spp.*; pH y a_w a *Clostridium botulinum*; pH, refrigeración y potencial redox a *Staphylococcus aureus* y los preservadores a hongos superficiales (Leistner, 1985).

Mediante la aplicación de este método, en los últimos años se han desarrollado una serie de procesos de preservación de alimentos combinando los siguientes factores:

* Reducción de la actividad de agua por agregado de alcoholes polihídricos, azúcares y/o sal.

* Retardo del crecimiento microbiano por adición de agentes antimicrobianos como el ácido sórbico, propiónico y benzoico.

* Reducción del pH del alimento de forma tal que sea compatible con las características organolépticas

Estos factores combinados, con o sin la inclusión de un tratamiento térmico suave permiten obtener alimentos microbiológicamente estables (Sajur, 1985; Kanterewicz y col., 1985; Alzamora y col., 1989).

La calidad de los alimentos de alta humedad puede modificarse por las reacciones de deterioro que pudieran ocurrir durante el almacenamiento de los mismos. En particular, las reacciones de pardeamiento no enzimático, la oxidación de lípidos, la oxidación de otros compuestos y la degradación de nutrientes.

En los últimos años se han comenzado a realizar estudios acerca de las reacciones de deterioro en este tipo de alimentos (Fox y Loncin, 1982; Cerruti y col., 1985; Petriella, 1986; Buera, 1986; Mauri, 1988; Guerrero, 1993). Así, por ejemplo, se sabe que la destrucción del ácido sórbico por un mecanismo oxidativo, conduce a concentraciones no efectivas del mismo lo que atentaría contra la estabilidad microbiológica. Además los productos de su degradación pueden participar en reacciones de pardeamiento no enzimático

alterando las características organolépticas y, en consecuencia, disminuyendo la vida útil del alimento (Vidyasagar y Arya, 1983 y 1984; Seow y Cheah, 1985 a y b).

1.2 - Acido sórbico - Generalidades

El ácido sórbico es un compuesto natural obtenido por A.H. Hoffman en 1859 a partir del aceite de serba inmadura, cuya estructura química fue determinada entre los años 1870 - 1890. Sin embargo, recién en 1900 fue obtenido en forma sintética y 40 años más tarde se conocieron sus propiedades antimicrobianas y se lo comenzó a producir en gran escala. A partir de este momento su uso se fue incrementando y en la actualidad es uno de los preservadores más empleados.

A partir de 1950 se han realizado numerosos estudios sobre las aplicaciones del ácido sórbico en la conservación de alimentos, su toxicidad y el mecanismo de su actividad antimicrobiana. En las últimas décadas se ha estudiado su uso potencial como agente antibotulínico en la preservación de productos cárnicos, especialmente en combinación con nitrito de sodio (Robach, 1980).

El ácido sórbico y sus sales solubles en agua, en particular el sorbato de potasio, colectivamente denominados sorbatos, constituyen los preservadores de mayor importancia comercial y sus aplicaciones son numerosas: alimentación humana y animal, productos farmacéuticos, cosméticos etc.

En base a numerosos estudios se ha establecido que los sorbatos inhiben el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. Sin embargo, su efectividad es más pronunciada frente a levaduras y hongos (Sofos y Busta, 1981; Liewen y Marth, 1985).

La acción antimicrobiana de los sorbatos depende de numerosos factores, entre otros: tipo y especie de microorganismo, grado de contaminación, composición y pH del sustrato, concentración de sorbato, actividad de agua, presencia de otros aditivos, temperatura de almacenamiento, material de empaque, método de preservación del alimento.

El mecanismo por el cual los sorbatos inhiben el crecimiento de microorganismos no está bien definido aún, pero se sabe que los sorbatos bloquean la germinación y el desarrollo celular y se han postulado diferentes mecanismos de acción, entre otros: alteración de la estructura morfológica de la célula, cambios en el material genético, alteración de la membrana celular, inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo o en las funciones de transporte.

Al igual que otros ácidos lipofílicos usados como preservadores, la acción del sorbato es más pronunciada a pH ácido. Sin embargo, a altos valores de pH, la forma disociada del compuesto posee acción antimicrobiana.

Los sorbatos son considerados como aditivos seguros o "GRAS" ("generally recognized as safe" o sea, generalmente reconocidos como seguros) y su uso es permitido por la legislación de numerosos países, entre ellos, la Argentina.

1.2.1 - Obtención del ácido sórbico

Diferentes procesos han sido probados y patentados para la obtención del ácido sórbico y sus derivados.

- Proceso de aislamiento de la fuente natural.

La separación del sorbato de la serba involucra las siguientes operaciones: molienda de las bayas, lixiviación con agua para obtener un jugo rojizo, concentración del jugo por evaporación, separación del ácido sórbico del jugo mediante una destilación por arrastre con vapor en medio ácido e isomerización para obtener el ácido sórbico (Lee y col., 1972).

- Procesos de síntesis de ácido sórbico.

En la producción comercial de ácido sórbico se han empleado fundamentalmente dos métodos:

a) Oxidación del 2,4-hexadienal.

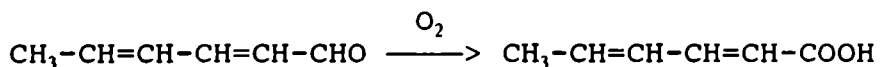
b) Reacción de condensación entre cetena y crotonaldehído. Este último es más usado actualmente.

a) Oxidación del 2,4-hexadienal.

Este método ha sido utilizado durante muchos años, pero en la actualidad no tiene relevancia comercial.

El sustrato empleado (2,4-hexadienal) se obtiene por condensación de 3 moléculas de acetaldehído, o bien por condensación de acetaldehído y crotonaldehído. Luego se realiza la oxidación del 2,4-hexadienal empleando aire como agente oxidante y catalizadores

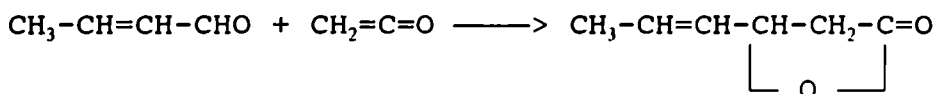
específicos para lograr la completa oxidación del sustrato a ácido sórbico y evitar reacciones secundarias que disminuirían el grado de conversión del reactivo (Sofos, 1989).



b) Condensación entre cetena y crotonaldehído.

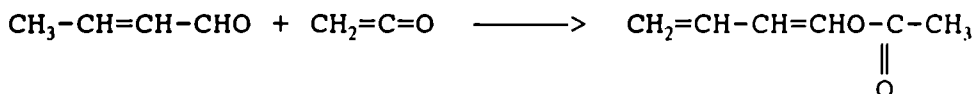
Este método fue uno de los primeros empleados comercialmente y aún es utilizado. En función del tipo de catalizador y de las condiciones de trabajo, la cetena y el crotonaldehído pueden reaccionar en dos formas diferentes para producir ácido sórbico.

Cuando se emplea ácido bórico o sales de zinc como catalizadores, la cetena y el crotonaldehído reaccionan formándose la β -lactona del polihexeno:



La lactona puede ser pirolizada formándose ácido sórbico.

En presencia de catalizadores ácidos fuertes, la cetena y el crotonaldehído forman un acetoxicompuesto:



La reacción se lleva a cabo empleándose un exceso de crotonaldehído con un solvente inerte (ej. tolueno) y a temperaturas que varían entre 10 y 90 °C. La adición de cetena se realiza en forma gradual y empleando agitación. Existen numerosas patentes que proponen el empleo de distintos catalizadores, entre los que se incluye zinc metálico, cloruro de zinc, sales metálicas de ácidos carboxílicos etc. (Sofos, 1989).

La conversión del polímero en ácido sórbico se puede llevar a cabo por diversas técnicas, tal como lo indican las patentes existentes. En general, se hidroliza el polímero por acción de temperatura y productos químicos obteniéndose ácido sórbico. Los catalizadores empleados en la hidrólisis incluyen: metales alcalinos, hidróxidos, ácidos inorgánicos, ácido acético, alcohol butílico, cloruro de zinc y sus combinaciones.

En general, el calentamiento del polímero se realiza en soluciones ácidas o básicas. El ácido comúnmente usado es clorhídrico y el álcali es hidróxido de sodio.

Un procedimiento para la producción de ácido sórbico consiste en el calentamiento a 80 °C de 200 g de poliéster con 4 g de sulfato de hidracina durante 30 min; luego se adicionan 200 g de ácido clorhídrico y se calienta a 80 °C por 90 min obteniéndose un 75,8 % de ácido sórbico (Uematsu y col., 1970).

- Purificación, cristalización y estabilización

El ácido sórbico producido debe ser purificado y estabilizado para su almacenamiento, distribución y empleo como preservador.

El proceso de purificación incluye el tratamiento con hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y carbón activado (Sato, 1980), destilación y cristalización en atmósfera de nitrógeno (Nakamura y Nakajima, 1970), lavado, destilación, secado al vacío (Minoda y Niihoda, 1970; Fernholz, 1961), cristalización a 98 °C en solución acuosa de hidróxido de sodio, calentamiento en solución de sorbato de potasio y precipitación del ácido sórbico por enfriamiento.

Un procedimiento específico para la purificación del ácido sórbico es descrito por Fernholz y Liberda (1975) y consiste en el calentamiento de 200 g de ácido sórbico a 80 - 90 °C en una solución acuosa de sorbato de potasio. Luego se enfría lentamente con agitación, finalmente se filtra obteniéndose entre 178 y 196 g de ácido sórbico con una pureza del orden de 95,9 - 99,8 % .

Generalmente se realiza la granulación del ácido sórbico para mejorar su solubilidad y facilitar su mezclado con los alimentos. Esta operación se lleva a cabo en extrusores. La mezcla a ser granulada debe ser previamente humectada. Para ello se adiciona una sustancia soluble en agua como sorbato de potasio o metanol, o bien un surfactante como lecitina. Diferentes patentes reportan procedimientos para la granulación: a continuación se detalla uno de ellos:

ácido sórbico en polvo con tamaño de partícula menor a 20 μm se solubiliza en metanol en caliente y se agregan 10 volúmenes de agua fría. Luego se remueve el metanol bajo vacío y la suspensión obtenida se pasa a través de un filtro de 400 mesh (número de orificios por pulgada lineal contados desde el centro de la malla hasta un punto ubicado a una pulgada de distancia) y se extruda en presencia de 18 a 40 % de agua, obteniéndose gránulos de ácido sórbico (Takano y Nakagima, 1977).

1.2.1.1 - Obtención de sales alcalinas

Las sales alcalinas del ácido sórbico se obtienen mediante la neutralización de éste último con carbonatos metálicos alcalinos, hidróxidos y alcóxidos, en presencia de determinados aditivos. Entre los distintos compuestos usados cabe mencionar: hidróxido de sodio y potasio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio y alcóxido de sodio. Los aditivos empleados son: acetona, gases inertes como nitrógeno, antioxidantes, alcoholes, cetonas y ésteres. Existen diferentes procedimientos los cuales son reportados por varias patentes. A modo de ejemplo se cita uno de ellos:

Se disuelven 29,03 kg de ácido sórbico en 181,44 kg de acetona a 45 °C, se adicionan 16,87 kg de una solución al 50 % de carbonato de potasio, la mezcla se refluja por 2 h. Luego se agregan 181,44 kg de acetona, la solución se enfría y se centrifuga, se lavan los cristales con acetona y se seca al vacío obteniéndose un 85 % de sorbato de potasio con una pureza del 99 %. (Kerr, 1966).

Para purificar y estabilizar las sales obtenidas se dispone de diferentes procedimientos. Uno de ellos consiste en la adición de 0,5 g de óxido de polipropileno a 500 ml de una solución acuosa de sorbato (53,5 %, pH 11); la mezcla se concentra a 100 ml a 50 °C a una presión de 77 mm Hg y luego se enfría a 20 °C obteniéndose un precipitado de sorbato de potasio (Minamidate y col., 1973).

Los procedimientos utilizados para la granulación son similares a los empleados en el caso del ácido sórbico. Aunque cabe destacar que, debido a que el sorbato de potasio tiende a descomponerse en presencia de humedad (Mc Carthy y Eagler, 1976), la cristalización y granulación deben realizarse a baja temperatura y con una humedad residual menor al 0,2 % (Noeltner, 1980).

1.2.2 - Propiedades del ácido sórbico

El ácido sórbico (2,4-hexadienoico) y sus sales son ampliamente usados como preservadores en una gran variedad de alimentos. Su utilidad como antimicrobianos depende de sus propiedades químicas, su reactividad, su solubilidad en agua y su estabilidad.

1.2.2.1 - Propiedades físico-químicas

El ácido sórbico es un ácido monocarboxílico α - β insaturado de cadena lineal (2,4-hexadienoico, $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$), cuya forma comercial corresponde al isómero trans-trans. El grupo carboxilo del

ácido sórbico es altamente reactivo pudiendo formar varias sales y ésteres. Las sales de importancia comercial son, el sorbato de calcio, sodio y potasio.

En la Tabla 1.3 se detallan las principales propiedades físicas y químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio.

El ácido sórbico es arrastrable por vapor, propiedad que es de gran utilidad para su aislamiento e identificación (Lueck, 1976).

1.2.2.1.1 - Solubilidad y partición

Como se observa en la Tabla 1.4, el ácido sórbico es más soluble en lípidos que en agua y a medida que se incrementa el pH de una solución acuosa la solubilidad del preservador aumenta (Lueck, 1976). Este incremento en la solubilidad se debe a la conversión parcial del ácido en sales más solubles.

Tanto la solubilidad del ácido sórbico como la del sorbato de potasio en agua, aceite, sacarosa, NaCl, propilenglicol, benceno y pentano aumentan con el incremento de temperatura. Este incremento es más marcado en el caso del ácido sórbico.

El conocimiento de la solubilidad del ácido sórbico en diferentes solventes permite estimar la mejor forma de adicionar el preservador y optimizar la concentración que será retenida en el medio en función de la composición del sistema. Por ejemplo, se sabe que la presencia de macromoléculas como propilenglicol, alginatos, pectinas, etc., mejoran la solubilidad.

En cuanto a las sales del ácido sórbico, éstas son solubles en agua, razón por la cual tienen una gran aplicación en alimentos, en especial, el sorbato de potasio por ser la que presenta la solubilidad más alta tal como se aprecia en la Tabla 1.5. Por otra parte, esta sal presenta mejores características organolépticas.

Cuando se adiciona sorbato de potasio se debe tener en cuenta que su actividad como antimicrobiano es un 74 % de la del ácido sórbico, es decir que para lograr una equivalente acción antimicrobiana deberá agregarse una mayor concentración de sorbato de potasio.

La solubilidad del ácido sórbico en los lípidos comestibles es tres veces mayor que en agua, como lo indica su coeficiente de partición (Tabla 1.6). En consecuencia, la concentración del preservador en la fase acuosa, disminuye con el incremento del tenor de lípidos.

Tabla 1.3: Propiedades físicas y químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Propiedad	Acido sórbico	Sorbato de potasio
Nombre químico	ácido 2,4-hexadienoico	sal de potasio del ácido 2,4-hexadienoico
Fórmula molecular	$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$	$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOK}$
Masa molar	112,13 g/mol	150,22 g/mol
Punto de inflamación	126 °C	————
Constante de ionización a 25 °C	$1,73 \cdot 10^{-5}$	————
Densidad a 20 °C (g/ml)	————	1,36
Rango de fusión (°C)	132-137	descomposición por encima de 270 °C
Calor de combustión, a 25 °C (Btu/lb)	11,927	————
Alcalinidad - Acidez	————	1,1 ml de NaOH 0,1 N a 0,8 ml de HCl 0,1 N por cada 1,1 g
Presión de vapor (mm Hg a 20 °C)	< 0,001	————
Presión de vapor (mm Hg a 120 °C)	10	————
Presión de vapor (mm Hg a 140 °C)	43	————
Punto de ebullición (en °C, a 760 mm Hg)	descomposición	————
Punto de ebullición (en °C, a 50 mm Hg)	143	————
Punto de ebullición (en °C, a 10 mm Hg)	119	————

Tabla 1.4: Solubilidad porcentual del ácido sórbico y del sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Solvente	Acido sórbico	Sorbato de potasio
Agua, 20 °C (pH 3,1)	0,15	58,20
Agua, 20 °C (pH 4,4)	0,22	—
Agua, 20 °C (pH 5,9)	1,02	—
Agua, 50 °C	0,55	61,00
Agua, 100 °C	4,00	64,00
Aceite de maíz, 20 °C	0,80	0,01
Aceite de maíz, 50 °C	2,00	0,03
Aceite de soja, 20 °C	0,52	—
Aceite de algodón, 20 °C	1,00	0,01
Sacarosa, 10 %	0,15	58,00
Sacarosa, 40 %	0,10	45,00
Sacarosa, 60 %	0,08	28,00
Cloruro de sodio, 5 %	0,11	47,00
Cloruro de sodio, 10 %	0,07	34,00
Cloruro de sodio, 15 %	0,04	12,00 - 15,00
Acido acético glacial	11,50 - 12,30	—
Acido láctico, 85,5 %	2,26	—
Acido cítrico, 50 %	0,26	—

Continuación Tabla 1.4

Acido fosfórico, 85 %	0,12	—
Etanol, 5 %	0,16	57,40
Etanol, 20 %	0,29	54,60
Etanol, 50 %	—	45,30
Etanol, 95 %	12,60 - 14,50	6,50
Etanol, 100 %	12,90 - 14,80	2,00
Propilenglicol, 20 °C	0,20	55,00
Propilenglicol, 50 °C	0,50	48,00
Propilenglicol, 100 °C	5,50	20,00
Pentano, 25 °C	0,15	—
Pentano, 50 °C	0,60	—
Pentano, 75 °C	1,80	—
Benceno, 25 °C	2,34	< 0,01
Benceno, 50 °C	8,14	—
Benceno, 75 °C	24,00	—
Eter etílico, 20 °C	5,00 - 5,30	0,10
Glicerol, 20°C	0,31	0,20
Acetona, 20 °C	9,20	0,10
Metanol, 20 °C	12,90	16,00
Ciclo hexano, 20 °C	0,28	—
Tetracloruro de carbono, 20 °C.	1,30	< 0,01

Tabla 1.5: Solubilidad de los sorbatos (Sofos, 1989).

Sorbatos	Solubilidad en agua a 20 °C (% m/v)
sorbato de potasio	58
sorbato de sodio	28-32
sorbato de calcio	1-2

Tabla 1.6: Coeficiente de partición del ácido sórbico (Sofos, 1989).

Solute adicionado		Solubilidad (%)		Coeficiente de partición
Sacarosa	Cloruro de sodio	Agua (a)	Lípido (b)	(b/a)
—	—	0,04	0,12	3,0
25	—	0,03	0,08	2,7
50	—	0,01	0,07	7,0
—	5	0,02	0,07	3,5
—	10	0,01	0,05	5,0

En general, el coeficiente de partición del ácido sórbico entre la fase lipídica y la fase acuosa depende del pH del alimento, la cantidad y naturaleza de los lípidos y la presencia de otros componentes. Así, el coeficiente de partición entre grasas cristalinas y agua es más bajo que entre aceites y agua (Lubieniecka von Shelhorn, 1967 a y b). La temperatura posee poca influencia, pero el agregado de componentes solubles como glucosa, sacarosa y NaCl lo incrementa marcadamente. En las bebidas alcohólicas, la solubilidad depende del contenido de alcohol, azúcar y de la temperatura (Loza y col., 1969).

1.2.2.2 - Reacciones en las que participa el ácido sórbico

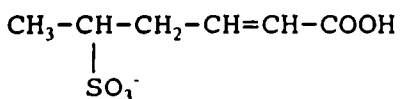
La presencia de dobles enlaces conjugados es una característica que determina el comportamiento químico altamente reactivo del ácido sórbico y sus sales.

Las reacciones de adición en las que participan los sorbatos son complejas debido a los diferentes modos de adición a los dobles enlaces. Por ejemplo, la hidrogenación parcial y la brominación, pueden ocurrir en diferentes posiciones de la molécula en función del tipo de catalizador y las condiciones de reacción empleadas. El ácido sórbico presenta la reacción de Diels - Alder con dienófilos como estireno, acrilatos, anhídrido maleico y en presencia de radicales libres, se polimeriza fácilmente (Sofos, 1989).

En esta sección se presentarán las reacciones más importantes que pueden ocurrir en un alimento por interacción de los sorbatos con otros componentes. Estas pueden afectar la estabilidad microbiológica y organoléptica del producto.

a) Reacción con el ion sulfito

La reacción entre el ácido sórbico y los óxidos de azufre (IV) ha sido ampliamente estudiada. Hägglund y Ringbom (1926) postularon que esta reacción era el resultado de la adición de HSO_3^- y daba el siguiente producto:

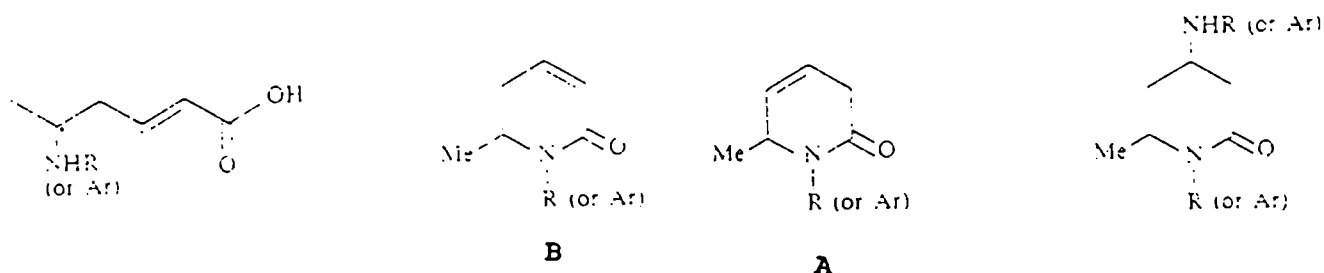


Dado que el ácido sórbico forma un solo producto de adición con el sulfito, esto indicaría que la reacción procede por adición 1,4 al dieno más que por adición 1,2 como se había supuesto en trabajos anteriores (Khandelwal y Wedzicha, 1990).

Este producto se forma a pH 3,5 y después de 65-100 días de almacenamiento a temperatura ambiente. El mismo parece ser lábil, ya que el ion sulfito es recuperado en su totalidad mediante una destilación por arrastre con vapor (Heintze, 1976). De acuerdo a esto y considerando el medio ácido del estómago, el compuesto formado sería inestable. Por lo tanto la reacción del ácido sórbico con el ion sulfito no tendría importancia desde el punto de vista toxicológico.

b) Reacción con aminas

El ácido sórbico reacciona con amonio, alquilaminas, aminas aromáticas y bencilamina a altas temperaturas (150 - 200 °C) formando los siguientes compuestos:



El compuesto B a altas temperaturas se isomeriza convirtiéndose en el compuesto A.

Se debe tener en cuenta que en algunas situaciones, como por ejemplo la cocción de queso a las brasas, podrían formarse compuestos de adición entre el ácido sórbico y aminas presentes en el producto (Khandelwal y Wedzicha, 1990).

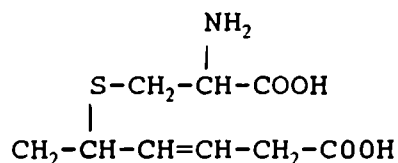
No hay evidencias de que el ácido sórbico reaccione con aminas simples como butilamina o con el grupo amino de la glicina en solución acuosa a pH 5 - 7, inclusive después de tratamientos térmicos prolongados a 100 °C (Wedzicha y Brook, 1989).

c) Reacción con tioles

El ácido sórbico en solución acuosa reacciona lentamente con tioles (38 y 32 $\mu\text{M}^1/1$ a 40 °C y pH 5,0; 2,3 y 2,5 $\text{M}^1/1$ a 80 °C y pH 3,7 -5,7). Estudios cinéticos indicaron que la reacción del ácido sórbico

con mercaptoetanol, ácido mercaptoacético, cisteína y glutatión, es de segundo orden, e involucra un ataque nucleofílico del ion tiolato al átomo de carbono 5 del ácido sórbico. La estequiometría de la reacción de adición es 1:1.

La reacción con cisteína parece conducir a la formación del ácido 3-hexenoico sustituido en la posición 5 como se indica a continuación:



Los compuestos de adición formados tienden a hidrolizarse tanto en condiciones ácidas como básicas. Esto dificulta su aislamiento y posterior análisis.

En alimentos, el ácido sórbico puede reaccionar con residuos de péptidos que contengan cisteína o con tioles, los cuales están presentes en aditivos saborizantes y aromatizantes. Por lo tanto, la concentración disponible del preservador puede disminuir como resultado de estas interacciones atentando contra la estabilidad microbiológica del producto.

Se debe tener en cuenta que en el medio ácido del estómago, los compuestos de adición formados son inestables, y no tendrían efectos toxicológicos.

Wedzicha y Zeb (1990 y 1991) informaron que la presencia de surfactantes (lecitina, tween 80) y de seroalbúmina bovina actúan como catalizadores de la reacción entre el ácido sórbico y los tioles.

d) Reacción con el ion nitrito

En numerosos estudios realizados se ha encontrado que bajo ciertas condiciones, el ácido sórbico y el nitrito de sodio reaccionan conduciendo a la formación de compuestos con actividad genotóxica sobre las bacterias.

En la Tabla 1.7, se detallan los compuestos aislados por reacción de sorbato y nitrito, asimismo se indica su capacidad mutagénica y antibacteriana.

Tabla 1.7: Productos de reacción del ácido sórbico y su actividad mutagénica y antimicrobiana (Sofos, 1989).

Producto de reacción	Actividad mutagénica		Actividad antimicrobiana <i>E. coli</i>
	Ensayo rec. de <i>B. subtilis</i>	Ensayo de <i>S. thyphymurium</i> TA98 TA100	
Acido etil-nitrólico (ENA) $\text{CH}_3\text{-C-NO}_2$ $\quad \parallel$ $\quad \text{NOH}$	++		+ (5 ppm)
1,2-dinitro-2-metil-pirrol (DNMP, Y) $\text{CH}_3 / \begin{array}{c} \diagup \text{NO}_2 \\ \diagdown \text{N} \\ \diagup \text{NO}_2 \end{array}$	+++	++	+ (5 ppm)
"B" $\text{C}_5 \text{H}_6 \text{O}_4 \text{N}_2$			+ (1 ppm)
"F" $\text{CH}_3\text{-C-C-CH=CH-COOH}$ $\quad \parallel \quad \parallel$ $\quad \text{N} \quad \text{N}$ $\quad \diagdown \quad \diagup$ $\quad \text{O} \quad \text{O}$			

El primer producto aislado con actividad genotóxica fue el ácido etilnitroso (ENA); este compuesto es altamente mutagénico. Otro producto de la reacción, designado como Y e identificado como 1,4-dinitro-2-metilpirrol (DNMP) es considerado el más activo de los mutágenos formados y se postula que se forma por una nitración y posterior descarboxilación del ácido sórbico (Kito y col., 1978).

El tercer producto de la reacción, llamado F, parece no ser genotóxico. Otro producto, el cual no ha podido ser caracterizado químicamente y al que se lo llama B, mostró ser poco tóxico.

Namiki y Kada (1975), encontraron que tanto la formación de estos compuestos, como la actividad mutagénica dependen del pH del medio, la temperatura y la relación entre la concentración de ácido sórbico y nitrito de sodio. Por ejemplo, la máxima actividad mutagénica se produce cuando el pH del medio está entre 3,5 y 4,2 y la relación molar entre el ácido sórbico y el nitrito de sodio es de 1:8.

Los productos formados son lábiles al calor. Así, a 100 °C y pH 6,0 el ENA y el DNMP son inactivados. En las condiciones en las que se cocina el tocino (167 °C, aceite de maíz), la actividad mutagénica de ambos productos se reduce a un 37 % en 3 minutos (Namiki y col., 1983).

Cabe mencionar que, aún empleando relaciones molares de ácido sórbico / nitrito de sodio de 1:0,2, algunos autores detectaron actividad genotóxica e inclusive mezclas que contenían de 0,01 a 0,04 % de nitrito de sodio y 0,1 % de ácido sórbico dieron resultados positivos en la prueba rec. para valores de pH menor a 6,0 (Sofos, 1989). Sin embargo, en otros trabajos en los que se emplearon bajas concentraciones molares de sorbato y nitrito y/o valores de pH más elevado no se detectó actividad mutagénica (Namiki y col., 1981).

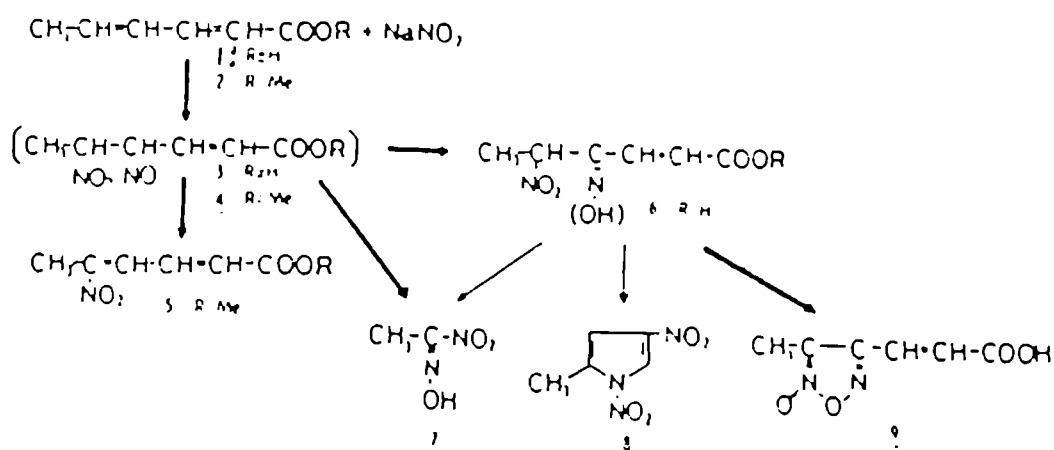
Se determinó que tanto el ácido ascórbico como la cisteína desactivan los productos formados por la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito de sodio (Hartman, 1983 ; Osawa y col., 1986). Otros componentes de los alimentos, como algunos tipos de jugos de vegetales, también inactivan estos compuestos (Namiki y col., 1980, 1981).

El nitrito de sodio también forma mutágenos con otros compuestos como piperina (uno de los principios pungentes de la pimienta) y otros análogos del ácido sórbico como el éster metílico del ácido sórbico (Osawa y Namiki, 1980).

Los resultados indican que una estructura de dieno-carbonilo conjugado parece esencial en la reacción con nitrito para formar compuestos mutagénicos, pero el mecanismo exacto de la reacción es desconocido. En la Figura 1.1 se detalla el mecanismo propuesto para la reacción entre el ácido sórbico o su éster metílico y el nitrito de sodio. Aparentemente, la presencia de un grupo nitro adyacente al doble enlace es un factor importante en el desarrollo de mutagenicidad (Osawa y Namiki, 1980).

De lo mencionado se concluye que se requieren realizar más investigaciones para establecer si, con las concentraciones de sorbato (o compuestos análogos) y nitrito eventualmente presentes en un producto cárnico, y las condiciones de pH y temperatura requeridas en la elaboración y almacenamiento, se pueden formar compuestos con actividad mutagénica. Además, estos compuestos podrían formarse *in vivo* después de la ingestión de alimentos no sólo por el aporte de sorbato y nitrito sino por el de otros constituyentes con una estructura química similar.

Figura 1.1: Mecanismo propuesto para la reacción entre el ácido sórbico o su éster metílico y el nitrito de sodio (Osawa y Namiki, 1982).



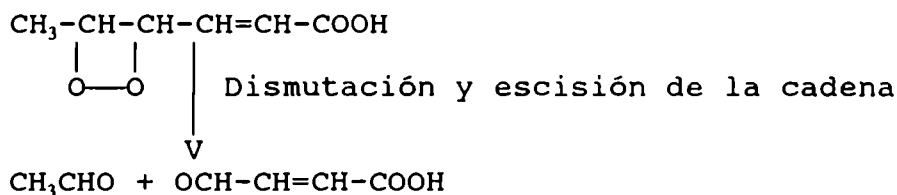
e) Reacción con aldehídos aromáticos

El ácido sórbico reacciona con distintos aldehídos aromáticos tales como p-oxibenzaldehído, p-dimetil-amino benzaldehído, vainillina y etilvainillina formando compuestos coloreados. Esta reacción, conocida como "reacción de Komarowsky" es útil en la cuantificación del ácido sórbico (Salo, 1963).

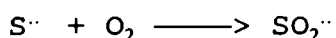
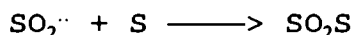
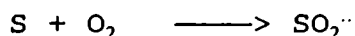
f) Oxidación del ácido sórbico

Los sorbatos en estado puro y al abrigo de la humedad son estables, pero en solución acuosa presentan inestabilidad, degradándose mediante un mecanismo oxidativo (Arya, 1980).

Marx y Sabalitschka (1965) informaron que la degradación oxidativa del ácido sórbico en solución acuosa conduce a la formación de acroleína, crotonaldehído y malonaldehído. Arya y Thakur (1988) aislaron los compuestos carbonílicos formados en la autooxidación de soluciones acuosas de ácido sórbico. Ellos establecieron que el acetaldehído y la β -carboxiacroleína constituyen alrededor del 80 % de los carbonilos totales encontrados en soluciones acuosas de ácido sórbico almacenadas. La formación de estos compuestos, indicaría que en solución acuosa el doble enlace de la posición 4,5 sería susceptible de un ataque oxidativo, conduciendo a la formación de un 4,5 cicloperóxido. La degradación de este peróxido cíclico por dismutación y escisión de la cadena, conduciría a la formación de acetaldehído y β -carboxiacroleína, como se indica a continuación:

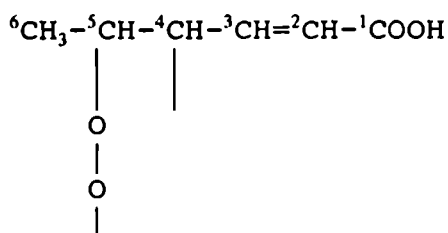


Según Pekkarinen (1969, a), la oxidación del ácido sórbico ocurre en un 40 % por adición de oxígeno al doble enlace ubicado entre los átomos de carbono 4 y 5 ($\text{CH}_3-\overset{5}{\text{C}}\text{H}=\overset{4}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$). El propone que la oxidación procede a través de un mecanismo en cadena que comienza con la formación de un diradical:



donde S: ácido sórbico; $\text{SO}_2^{\cdot\cdot}$: diradical

La estructura del diradical podría ser la siguiente:



Este peróxido es lábil, y se transformaría en un 4,5 cicloperóxido, el cual se descompondría a acetaldehído y β -carboxiacroleína o bien polimerizaría. El acetaldehído y la β -carboxiacroleína fueron detectados como productos de la degradación, lo cual confirmaría la adición de oxígeno al doble enlace situado entre los átomos de carbono 4 y 5. Se detectaron también, en pequeñas cantidades, crotonaldehído y acetona.

En presencia de aminoácidos, la β -carboxiacroleína se polimeriza rápidamente formando pigmentos pardos. Según Thakur y Arya (1988), en presencia de glicina, los aldehídos α, β -insaturados se polimerizan más rápidamente que los aldehídos saturados y, en consecuencia, se obtiene una mayor proporción de acetaldehído que de β -carboxiacroleína. Debido al rápido decaimiento de los aldehídos insaturados, la concentración de carbonilos totales es significativamente menor cuando hay aminoácidos presentes (Arya, 1980).

1.2.3 - Degradación del ácido sórbico

El principal mecanismo de degradación del ácido sórbico es su autooxidación, si bien este preservador es también susceptible de ser degradado por acción radiolítica y microbiana.

1.2.3.1 - Degradación oxidativa del ácido sórbico

La misma ha sido comentada en la sección 1.2.2.2 f.

1.2.3.1.1 - Cinética de degradación

En general, la degradación del ácido sórbico puede ser aproximada a una cinética de primer orden (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1983; Seow y Cheah, 1985, a; Gerschenson y col, 1986; Guerrero y col., 1990)

$$-dc/dt = k.c$$

donde: c = concentración de ácido sórbico (g/l)
 t = tiempo (día)
 k = constante de velocidad (día⁻¹)

Sin embargo, Bolin y col. (1980) encontraron que en el caso de ciruelas de alta humedad, la reacción de degradación del ácido sórbico no se ajustaba a una cinética de primer orden.

En general, la dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura se ajusta al modelo de Arrhenius (Seow y Cheah, 1985,a; Gerschenson y col., 1986 y 1987; Guerrero y col, 1990).

1.2.3.1.2 - Factores que afectan la destrucción

En esta sección se mencionarán brevemente los principales factores que afectan la estabilidad de los sorbatos de acuerdo a la bibliografía existente, ya que más adelante se hará un análisis exhaustivo de cada uno de ellos, debido a que éste es el tema central de esta tesis.

La destrucción del ácido sórbico tanto en solución acuosa como en alimentos está influenciada por numerosos factores, tales como: pH, trazas de iones metálicos, azúcares, sales, otros humectantes, aminoácidos, antioxidantes, luz, material de empaque, etc.

La oxidación de soluciones acuosas de ácido sórbico es significativamente acelerada por la luz (Saxby y col., 1982). Por ejemplo, una solución al 0,15 % almacenada durante un año expuesta a la luz se descompone en un 90 %, mientras que al abrigo de la luz, se descompone en un 60 % (Pekkarinen, 1969).

La pérdida de ácido sórbico se acelera con la disminución de pH (Arya, 1980; Gerschenson y col., 1986 y 1987). El acidificante usado también tiene una fuerte influencia sobre la velocidad de destrucción (Vidyasagar y Arya, 1983).

Las altas temperaturas y los tiempos de calentamiento prolongados aceleran la descomposición del ácido sórbico, por lo tanto, es conveniente almacenar sus soluciones en un lugar fresco.

El efecto de los iones metálicos como cobre, cobalto y manganeso, depende de su concentración. Una concentración de Fe³⁺ del orden de 10⁻³ mol/l acelera la oxidación del ácido sórbico en una solución acuosa que contiene 0,052 mol/l de ácido cítrico, mientras que mayores

concentraciones de Fe^{3+} poseen un efecto inhibitorio. La adición de cobre disminuye también la degradación (Pekkarinen, 1969).

En general, el cloruro de sodio y el de potasio tienen un efecto protector sobre la oxidación, mientras que los sulfatos y fosfatos de sodio, potasio y amonio actúan como prooxidantes (Vidyasagar y Arya, 1983).

La adición de metabisulfito de sodio o dióxido de azufre incrementa la velocidad de degradación de los sorbatos. Además, se observó que el incremento de grupos carbonilos no es proporcional al aumento de la constante de velocidad de destrucción, debido a la formación de compuestos de adición entre los grupos carbonilos producidos por la oxidación del sorbato y el metabisulfito (Vidyasagar y Arya, 1983).

Los alcoholes inhiben la degradación del ácido sórbico en soluciones de ácido sulfúrico y el etanol es un inhibidor ligeramente más efectivo que el metanol (Pekkarinen y Soimakallio, 1968).

El material de empaque afecta severamente la estabilidad del ácido sórbico durante el almacenamiento del producto. La degradación disminuye si se emplean materiales de empaque con baja permeabilidad al oxígeno como vidrio, películas laminadas. También es posible disminuir la degradación mediante la adición de antioxidantes en el material de empaquetamiento (Mc Carthy y col., 1973).

La presencia de aminoácidos y glicerol acelera la degradación e incrementa la formación de pigmentos pardos (Arya, 1980; Arya y Thakur, 1988).

En algunos casos, las pérdidas de ácido sórbico en alimentos son menores que en sistemas modelo acuosos. En jugos de fruta pasteurizados (por ejemplo de manzana, grosella negra y uva) la descomposición del ácido sórbico fue menor al 3 % en 320 días a 20 °C, mientras que una solución acuosa de similar composición y en las mismas condiciones de almacenamiento se degradó en un 25 % .(Heintze, 1971) lo que mostraría efectos específicos de los componentes de los jugos.

En algunos productos grasos, como manteca y grasa de cerdo, las pérdidas de ácido sórbico son considerables. Además, la presencia de este preservador, exalta la oxidación del producto (Steinbach y col., 1963).

En productos cárnicos curados, se observó que las pérdidas de sorbato varían en función del tipo de producto, las condiciones de almacenamiento y de procesamiento. No se observaron cambios en el

contenido de sorbatos durante el almacenamiento bajo refrigeración de tocino (Robach y col., 1980). Sin embargo, en fetas de jamón de campo se detectaron pérdidas de hasta un 50 % al cabo de 30 días de almacenamiento a 22 °C y 70 % de humedad relativa (Baldock y col., 1979).

Durante el almacenamiento de frutas de humedad alta e intermedia, el ácido sórbico se degrada en función de las condiciones de almacenamiento y contribuye al desarrollo del pardeamiento del producto (Vidayasagar y Arya, 1984).

En base a lo mencionado, tanto en sistemas modelo como en alimentos, el ácido sórbico es susceptible de degradarse e interaccionar con otros componentes del alimento lo que conlleva a una pérdida del preservador la cual podría atentar contra la estabilidad microbiológica del producto, además de alterar la calidad organoléptica.

1.2.3.2 - Degradación radiolítica del ácido sórbico

La irradiación de alimentos hasta niveles de 10 kilogray (Kgy) es reconocida como un método seguro desde el punto de vista toxicológico (Urbain, 1978). Sin embargo, esta dosis es insuficiente para lograr la estabilidad microbiológica, por lo que se ha sugerido el uso combinado de irradiación y antimicrobianos para lograr la estabilidad (Licciardello y col, 1984).

Ishizaki y col. (1972) encontraron que el ácido sórbico en solución acuosa se degrada por acción de la irradiación. En medio acuoso, el primer efecto de la irradiación es la radiólisis del agua, que conduce a la formación de electrones hidratados, radicales hidroxilo y átomos de hidrógeno. Estos productos son inestables y desaparecen, ya sea por reacción entre ellos o por reacción con el ácido sórbico y/o otros constituyentes del alimento. Estas reacciones son muy rápidas, del orden de 10^{10} - 10^{11} M/S⁻¹ y su velocidad está controlada por la difusión de los primeros productos de reacción (Simic, 1983). De los productos formados por la radiólisis del agua, los radicales hidroxilo son los más reactivos frente a los compuestos insaturados, especialmente frente a los polienos conjugados. La elevada susceptibilidad del ácido sórbico a la degradación por irradiación podría ser atribuida a su estructura de polieno conjugado. Entonces, la velocidad de degradación estará gobernada por la difusión de radicales hidroxilo, electrones hidratados y átomos de hidrógeno y por la presencia de otros solutos que compitan con el ácido sórbico por reaccionar con los productos de la radiólisis del agua.

Thakur y col. (1990) estudiaron la degradación radiolítica del ácido sórbico en sistemas modelo. Estos autores encontraron que la

degradación radiolítica de los sorbatos depende de: la dosis de irradiación, el pH del medio, la naturaleza del solvente, la presencia de otros componentes (azúcares, hidrocoloides, aminoácidos, acidificantes, sales, trazas de metales), el contenido de humedad, etc.

A diferencia de la degradación oxidativa, en la radiólisis del sorbato, no se observa un incremento apreciable de grupos carbonilo, ni la aparición de pardeamiento.

A continuación se analizarán los diferentes factores que afectan la degradación radiolítica del ácido sórbico.

1.2.3.2.1 - Factores que afectan la degradación radiolítica del ácido sórbico

a) Influencia de la dosis de irradiación

La degradación radiolítica en solución acuosa se incrementa linealmente con la dosis de irradiación en el rango de 2,5 a 20 Kgy (Thakur y col., 1990).

b) Influencia del pH

Se encontró que, al incrementarse el pH, disminuye el grado de degradación radiolítica en forma lineal, lo que indica una mayor tendencia de la forma no disociada a degradarse. La mayor susceptibilidad de los ácidos grasos a degradarse a pH más bajo fue reportada por Simic (1983) y este autor considera que se debe a la mayor reactividad de los grupos carboxilo no disociados hacia los electrones hidratados. También podría deberse a la mayor formación de radicales primarios a partir del agua, en medio ácido (Thakur y col., 1990).

c) Influencia del solvente

La naturaleza del solvente afecta significativamente la degradación radiolítica. En medio alcohólico, la degradación es mucho menor que en medio acuoso. De los alcoholes estudiados (metanol, etanol, isopropanol y n-butanol), se observó menor degradación en isopropanol y en metanol.

d) Influencia de los azúcares y de los hidrocoloides

Thakur y col. (1990) estudiaron la degradación radiolítica del ácido sórbico en soluciones 0,2 M de distintos azúcares (glucosa, fructosa, maltosa, galactosa, celobiosa, rafinosa, sorbosa) y en soluciones al 2 % de hidrocoloides (gelatina, goma arábiga, carboximetilcelulosa, goma xántica y pectinas). Estos autores encontraron que todos los azúcares y todos los hidrocoloides analizados, con excepción de las pectinas, tienen un efecto catalítico sobre la degradación. Además, este efecto se incrementa al aumentar la concentración de azúcar.

e) Influencia de los ácidos carboxílicos y sales

Thakur y col. (1990) también estudiaron el efecto de distintos ácidos carboxílicos y sales sobre la degradación radiolítica del ácido sórbico. Estos autores informaron que los ácidos cítrico, láctico y málico aceleran la degradación, mientras que los ácidos oxálico y maleico tienen un efecto protector. Cabe destacar que, la conclusión sobre el efecto acelerante de los ácidos mencionados requeriría mayores estudios ya que, en este trabajo, se comparaba el porcentaje de degradación en presencia del acidificante contra un sistema control cuyo pH era mayor al del sistema en estudio. Por lo tanto, no es posible discernir si el efecto prooxidante observado se debe al acidificante o a la disminución de pH ocasionada por su agregado.

En cuanto al efecto de las sales, se reportó que en general, las sales de sodio y potasio (nitrito, nitrato, acetato, citrato, sulfato, tiosulfato, bicarbonato, carbonato, cloruro) tienen un efecto protector. Sin embargo, como ya se mencionó en el párrafo anterior, en este caso también se comparaba el porcentaje de degradación en presencia de sal contra un sistema control cuyo pH era diferente. Por lo tanto, en algunos casos no es posible aseverar que el efecto protector se deba a la sal *per se*. En particular, los sistemas con nitrato tenían un pH semejante al control, razón por la cual, se evidencia claramente el efecto protector de dicho anión.

f) Influencia de los aminoácidos

El efecto de los aminoácidos sobre la degradación es diverso. Glicina, leucina, lisina y serina no ejercen efectos apreciables sobre la degradación, pero la presencia de arginina y treonina aceleran la velocidad de destrucción (Thakur y col., 1990).

g) Influencia de los metales de transición

Thakur y col. (1990) investigaron el efecto de 100 ppm de Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} y de Ni^{2+} sobre la degradación radiolítica del ácido sórbico. Ellos observaron que el Cu^{2+} ejercía un importante efecto protector, mientras que los otros metales no influenciaban en forma apreciable la degradación.

h) Influencia de los ácidos grasos

Las grasas y aceites tienen un efecto protector sobre la degradación radiolítica del ácido sórbico. El mismo es más acentuado en las grasas insaturadas. Este efecto se debería a que en ellas, los radicales primarios serían más voluminosos (Nawar, 1978) y, por ende, su movilidad sería menor a la de los radicales hidroxilo. En consecuencia, la probabilidad de que estos radicales interactúen con el ácido sórbico sería más baja y éste sería más estable. De hecho, la degradación del ácido sórbico en grasas y aceites podría ser el resultado de la interacción con la energía radiante, antes que de la reacción con otros radicales libres formados como resultado de la radiólisis de los mismos. En el caso de aceites vegetales altamente insaturados, la mayor parte de la energía es absorbida por los ácidos grasos no saturados y, por ende, el ácido sórbico no es degradado.

i) Influencia del contenido de humedad

La degradación radiolítica del ácido sórbico, disminuye al deprimirse el contenido de humedad del sistema (Thakur y col., 1990).

1.2.3.3 - Degradación del ácido sórbico por acción de microorganismos

El ácido sórbico puede ser degradado por la acción de bacterias, levaduras y hongos (Sofos, 1989).

a) Bacterias

Si bien los sorbatos son eficaces inhibidores del crecimiento bacteriano, algunas bacterias son resistentes a su acción y además, algunas de ellas, bajo ciertas condiciones son capaces de metabolizar y degradar este preservador (Liewen y Marth, 1985). En especial, las bacterias ácido-lácticas producen cepas que metabolizan los sorbatos, cuando estos se encuentran en concentraciones subletales y el grado

de contaminación es alto (Raduchev y Rizvanov, 1963; Horwood y col., 1981).

Dentro de las bacterias ácido-lácticas que pueden metabolizar los sorbatos se encuentran: *Lactobacillus plantarum*, *S. lactis*. Entre otras especies de bacterias se incluyen: *Acetobacter spp.* y *Pseudomonas fluorescens* (Raduchev y Rizvanov, 1963; Liewen y Marth, 1985).

La destrucción de los sorbatos por acción de bacterias ácido-lácticas en vinos y vegetales fermentados se ha relacionado con la pérdida de calidad producida por el desarrollo de olores tipo "geranio" (Wuerdig, 1985; Liewen y Marth, 1985). Los metabolitos aislados y relacionados con este deterioro son, etilsorbato, ácido 4-hexenoico, 1-etoxi-2,4-hexadieno y 2-etoxi-3,5-hexadieno (Wuerdig, 1985). El origen del olor tipo "geranio" se atribuye a la reacción entre el hexadienol (producto de la degradación del sorbato) con etanol, formando 1-etoxi-2,4-hexadieno y 2-etoxi-3,5 hexadieno. Este tipo de deterioro ocurre en vinos con bajos niveles de sorbatos (menores al 0,03 %) y es detectable sólo cuando un sexto a un tercio del sorbato ha desaparecido. Se asocia a vinos con un alto nivel de contaminación y malas prácticas de manufactura.

Dentro de las bacterias ácido-lácticas aisladas de uvas y vino, se ha encontrado una gran variación en cuanto a la tolerancia al sorbato. De 28 cepas de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* analizadas en medios de cultivo que contenían sorbato, se encontró que 19 cepas de *Leuconostoc* producían alcohol sórbico. El resto no era capaz de degradar el preservador (Edinger y Splittstoesser, 1986). Además se encontró que en bacterias ácido-lácticas aisladas de otras fuentes y colocadas en las condiciones típicas de un vino (pH 3,5), el sorbato en niveles del 0,1 % no resultaba degradado e inclusive, inhibía el desarrollo bacteriano. Pero si se aumentaba el pH del medio y se disminuía el tenor de sorbato, no resultaba inhibido el crecimiento bacteriano.

La capacidad de las bacterias para degradar al ácido sórbico está determinada por la presencia de enzimas involucradas en el metabolismo del preservador.

b) Levaduras

Si bien diferentes investigadores han indicado la existencia de cepas de levaduras resistentes a los sorbatos, la información sobre la degradación del preservador por acción de levaduras es contradictoria. Algunos estudios indican que ciertas levaduras (*Procandida albicans*, *Procandida tropicalis* y *Candida claussenii*) asimilan el sorbato como única fuente de carbono (Deak y Novak, 1972). Sin embargo, este hecho ocurre solamente si la concentración de sorbatos es baja y depende además del pH y del tenor de glutation

reducido ya que éste promueve la asimilación del preservador. Si la concentración del mismo es elevada, éste inhibe el crecimiento de las levaduras.

c) Hongos

Algunas cepas de hongos, bajo ciertas condiciones, son resistentes a la acción inhibitoria de los sorbatos y algunas de ellas, e inclusive, son capaces de metabolizarlos.

Melnick y col.(1954) determinaron que la desaparición de sorbatos en quesos se debe a la acción de hongos. También en productos frutícolas como jugos, jaleas, pulpas que fueron inoculados con hongos, se determinó que la desaparición del preservador era consecuencia de la acción metabólica de los hongos (Rehm y col., 1964).

La velocidad de descomposición de los sorbatos depende del pH del sustrato, del nivel de inóculo, de la concentración del preservador y del nivel de contaminación del producto.

Marth y col. (1966) reportaron una serie de especies de hongos que metabolizan sorbatos: *P. roqueforti*, *P. notatum*, *P. frequentans*, *P. cyanofulvum*. También Fino y col.(1982) encontraron que hongos del genero *Penicillium* aislados de quesos deteriorados, metabolizaban los sorbatos.

Los productos de la metabolización de los sorbatos por acción fúngica incluyen dióxido de carbono y agua, 1,3-pentadieno, metilcetonas, trans-4-hexenol, etilsorbato (el cual es convertido en trans-4-hexenol) y 2S,3R-diol-4-trans-6-trans-octadieno (Sofos, 1989).

La capacidad de metabolizar sorbatos a 1,3-pentadieno parece ser distintiva de los hongos del género *Penicillium* (Liewen y Marth, 1985) y ocurre a través de una reacción de descarboxilación. La presencia de 1,3-pentadieno confiere al producto un flavor a hidrocarburo.

En resumen, la degradación de los sorbatos, mediante el metabolismo de hongos, ocurre sólo por acción determinadas cepas, bajo condiciones específicas de crecimiento, niveles subinhibitorios de sorbatos, pH apropiado y alta contaminación del producto.

1.2.4 - Acción antimicrobiana

Numerosos estudios han reportado que los sorbatos retardan el crecimiento de distintos microorganismos, entre los que se incluyen bacterias, hongos y levaduras.

La acción inhibitoria de los sorbatos es generalmente más pronunciada sobre hongos y levaduras.

a) Hongos

Los sorbatos son efectivos inhibidores del crecimiento de hongos tanto en medios de cultivo como en alimentos (Tabla 1.8). La mínima concentración inhibitoria de sorbatos está en el rango de 0,001 a 0,1 % y depende de la especie, la cepa, el pH del sustrato y de otros factores (Bandelin, 1958; Klis y col., 1958).

La acción inhibitoria de los sorbatos sobre los hongos ocurre en todas las etapas de su desarrollo, incluyendo la germinación de esporas, el inicio del crecimiento y la formación del micelio.

En varios estudios se ha informado que el sorbato inhibe la producción de micotoxinas en medios de cultivo y en alimentos. Entre las micotoxinas inhibidas por el sorbato se incluyen: aflatoxinas, patulina, esterigmatocistina, citrinina y ocratoxina (Bullerman, 1983; Roland y Beuchat, 1984, a y b; Bullerman, 1985; Marshall y Bullerman, 1986; Gourama y Bullerman, 1988).

Algunos estudios indican que, bajo ciertas condiciones y con niveles subinhibitorios de sorbatos, estos podrían estimular la formación de micotoxinas (Marshall y Bullerman, 1986).

La inhibición de la biosíntesis de micotoxinas por acción de los sorbatos podría deberse a la inhibición del transporte de sustancias desde el sustrato a la célula (Yousef y Marth, 1983). La estimulación de la síntesis de micotoxinas se ha atribuido a la posibilidad de que este preservador, en cantidades cercanas a su mínima concentración inhibitoria, disminuya la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico, lo que lleva a una acumulación de acetilcoenzima A, la cual es un intermediario esencial para la síntesis de ciertas micotoxinas (Gareis y col., 1984).

En síntesis, se puede decir que, en general, los sorbatos son eficaces inhibidores del crecimiento de hongos y de la producción de micotoxinas en alimentos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que niveles subinhibitorios de sorbatos pueden estimular la síntesis de micotoxinas por determinadas especies de hongos y bajo condiciones específicas.

Tabla 1.8: Hongos inhibidos por la acción de los sorbatos (Sofos, 1989).

<i>Alternaria citri</i>	<i>Mucor mucedo</i>
<i>A. tenuis</i>	<i>M. racemosus</i>
<i>Alternaria spp.</i>	<i>M. silvaticus</i>
<i>Ascochyta cucumis</i>	<i>Mucor spp.</i>
<i>Ascochyta spp.</i>	<i>Myrothecium roridum</i>
<i>Aspergillus allii</i>	<i>M. verrucaria</i>
<i>A. amstelodami</i>	<i>Myrothecium sp.</i>
<i>A. candidus</i>	<i>Oospora lactis (Geotrichum)</i>
<i>A. clamydosporii</i>	<i>O. microcarpa</i>
<i>A. clavatus</i>	<i>Papularia arundinis</i>
<i>A. elegans</i>	<i>Penicillium atromentosum</i>
<i>A. flavus</i>	<i>P. chermesinum</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>P. chrysogenum</i>
<i>A. glaucus</i>	<i>P. citrinum</i>
<i>A. niger</i>	<i>P. cyaneum</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>P. digitatum</i>
<i>A. parasiticus</i>	<i>P. duclauxi</i>
<i>A. penicilloides</i>	<i>P. expansum</i>
<i>A. sulphureus</i>	<i>P. frequentans</i>
<i>A. sydowi</i>	<i>P. funiculosum</i>
<i>A. terreus</i>	<i>P. gladioli</i>
<i>A. unguis</i>	<i>P. glaucum</i>
<i>A. ustus</i>	<i>P. herquei</i>
<i>A. versicolor</i>	<i>P. implicatum</i>
<i>A. wentii</i>	<i>P. italicum</i>
<i>Aspergillus spp.</i>	<i>P. janthinellum</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>P. notatum</i>
<i>B. fabae</i>	<i>P. oxalicum</i>
<i>Byssochlamys fulva</i>	<i>P. patulum</i>
<i>B. nivea</i>	<i>P. piscarium</i>
<i>Cephalosporium spp.</i>	<i>P. puberulum</i>
<i>Cercospora spp.</i>	<i>P. purpurogenum</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>P. restrictum</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>P. roquefortii</i>
<i>C. herbarum</i>	<i>P. rugulosum</i>
<i>Cladosporium spp.</i>	<i>P. sublateralium</i>
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	<i>P. thomii</i>
<i>C. phomoides</i>	<i>P. urticae</i>
<i>Cunninghamella echinulata</i>	<i>P. variable</i>
<i>Curvularia trifolii</i>	<i>P. viridicatum</i>
<i>Fusarium acuminatum</i>	<i>Penicillium spp.</i>
<i>F. episphaeria</i>	<i>Pestalotiopsis macrotricha spp.</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>Phoma spp.</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Pullularia pullulans</i>
<i>F. roseum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>F. rubrum</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
<i>F. solani</i>	<i>R. javanicus</i>
<i>F. iricinctum</i>	<i>R. nigricans</i>
<i>Fusarium spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Rosellinia spp.</i>
<i>Geotrichum spp.</i>	<i>Sporotrichum pruinosum</i>
<i>Gliocladium roseum</i>	<i>Stagonospora spp.</i>
<i>Helminthosporium spp.</i>	<i>Stysanus spp.</i>
<i>Heterosporium terrestre</i>	<i>Thielavia basicola</i>
<i>Humicola fusco-atra.</i>	<i>Trichoderma lignorum</i>
<i>Monilia acetobutans</i>	<i>T. viride</i>
<i>M. candida</i>	<i>Trichoderma spp.</i>
<i>Monilia spp.</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	<i>Truncatella spp.</i>

b) Levaduras

La acción inhibitoria de los sorbatos frente a las levaduras ha sido extensamente estudiada (Emard y Vaughn, 1952; Ferguson y Powrie, 1957). En la Tabla 1.9, se detallan las distintos géneros y especies de levaduras inhibidos por el sorbato. La concentración de sorbato necesaria para inhibir el desarrollo de levaduras se encuentra en el rango de 0,0025 - 0,2 % y depende de distintos factores tales como especie, cepa, pH del sustrato, presencia de oxígeno, tratamiento térmico.

Los sorbatos inhiben el desarrollo de levaduras en vegetales fermentados, vinos, jugos de frutas, frutas secas de alta humedad, superficie de jamones y en pescado ahumado.

La inhibición de las levaduras es especialmente importante en alimentos ácidos de actividad de agua intermedia como aderezos, jarabes, productos en base a tomate, mermeladas, jaleas, golosinas (Restiano y col., 1982; Liewen y Marth, 1985).

c) Bacterias

La acción inhibitoria de los sorbatos frente a las bacterias no es tan amplia como lo es frente a hongos y levaduras. Sin embargo, muchas bacterias, entre las que se incluyen especies patógenas y deteriorativas, son inhibidas por este preservador (Tabla 1.10). Las bacterias de mayor interés en alimentos, inhibidas por los sorbatos son: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus spp*, y *Clostridium botulinum*.

Las concentraciones de sorbato necesarias para inhibir el desarrollo bacteriano se encuentran en el rango de 0,001 a 1 % y dependen de la especie y cepa de bacteria, el nivel de contaminación, la composición del producto, la actividad de agua, el pH, la presencia de otros aditivos, el proceso de preservación aplicado al producto, las condiciones de almacenamiento y el tipo de envase (Sofos y Busta, 1981).

El interés en las propiedades antibacterianas de los sorbatos, se ha incrementado a partir de la década del 70, en parte debido a los esfuerzos por encontrar preservadores que permitan reemplazar el uso de nitrito de sodio en las carnes curadas, debido al potencial carcinogénico de las nitrosaminas formadas por reacción de este último.

Tabla 1.9: Levaduras inhibidas por la acción de los sorbatos (Sofos, 1989).

<i>Brettanomyces clausenii</i>	<i>Pichia silvestris</i>
<i>B. versatilis</i>	<i>Pichia</i> spp.
<i>Brettanomyces</i> spp.	<i>Rhodotorula flava</i>
<i>Byssoschlamys fulva</i>	<i>R. glutinis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>R. gracilis</i>
<i>C. clausenii</i>	<i>R. minuta</i>
<i>C. intermedia</i>	<i>R. mucilaginoso</i>
<i>C. krusei</i>	<i>R. rubra</i>
<i>C. lipolytica</i>	<i>Rhodotorula</i> spp.
<i>C. melibiosii</i>	<i>Saccharomyces acidifaciens</i>
<i>C. mycoderma</i>	<i>S. apiculatus</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>S. bayanus</i>
<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>S. beticus</i>
<i>C. pulcherrima</i>	<i>S. bisporus</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>S. carlsbergensis</i>
<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Candida</i> spp.	<i>S. delbrueckii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>S. fragilis</i>
<i>C. terreus</i>	<i>S. lactis</i>
<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>S. rouxii</i>
<i>Debaryomyces membranefaciens</i>	<i>Saccharomyces</i> spp.
<i>Debaryomyces</i> spp.	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>
<i>Eudomycesopsis ohmeri</i>	<i>Sporobolomyces</i> sp.
<i>Hansenula anomala</i>	<i>Torula lipolytica</i>
<i>H. apiculata</i>	<i>T. utilis</i>
<i>H. minuta</i>	<i>Torulasporea rosei</i>
<i>H. saturnus</i>	<i>Torulopsis candida</i>
<i>H. subpelliculosa</i>	<i>T. caroliniana</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>T. holmii</i>
<i>K. lafarrii</i>	<i>T. minor</i>
<i>K. magna</i>	<i>T. miso</i>
<i>Mycoderma aceti</i>	<i>T. polcherrima</i>
<i>M. cerevisiae</i>	<i>T. versutalis lipofera</i>
<i>M. vini</i>	<i>Torulopsis</i> spp.
<i>Mycoderma</i> spp.	<i>Trichosporon variable</i>
<i>Pichia alcoholophila</i>	<i>Zygosaccharomyces globiformis</i>
<i>P. membranefaciens</i>	<i>Z. halomembranis</i>
<i>P. polymorpha</i>	

Tabla 1.10: Bacterias inhibidas por la acción de los sorbatos (Sofos, 1989).

<i>Acetobacter aceti</i>	<i>L. brevis</i>
<i>A. xylinum</i>	<i>L. bulgaricus</i>
<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Moraxella</i> spp.
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
<i>Alteromonas putrefaciens</i>	<i>Propionibacterium freundenreichii</i>
<i>Aritrobacter</i> spp.	<i>P. zoe</i>
<i>A. agilis</i>	<i>Proteus morgunii</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>B. polymyxa</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>P. fragi</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>S. heidelberg</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>S. montevideo</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>S. typhimurium</i>
<i>C. sporogenes</i>	<i>Sarcina lutea</i>
<i>C. toanum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. freundii</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>Flavobacterium-cytophaga</i> spp.	<i>S. lucis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>L. arabinosus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Diferentes investigadores han reportado que los sorbatos, en concentraciones mayores al 0,1 %, solos o en combinación con nitrito de sodio (0,004 - 0,008 %) inhiben el crecimiento del *C. botulinum* y la producción de toxina en medios de cultivo y en distintos alimentos cárnicos (Ivey y Robach, 1978; Ivey y col., 1978; Blocher y Busta, 1985).

La acción inhibitoria de los sorbatos sobre el desarrollo bacteriano parecería consistir en prolongar la fase lag de crecimiento y no tener mayor influencia sobre la fase exponencial (Chung y Lee, 1982; Greer, 1982). Sin embargo, otros estudios han reportado un efecto inhibitorio en todas las fases (lag, exponencial y estacionaria) (Zamora y Zaritzky, 1987, a y b). El efecto antibacteriano de los sorbatos se incrementa por el uso combinado con otros preservadores (Larocco y Martin, 1981).

1.2.4.1 - Factores que afectan la acción antimicrobiana de los sorbatos

La actividad antimicrobiana de los sorbatos está influenciada por numerosos parámetros, entre ellos: factores ambientales (condiciones de almacenamiento); tipo de proceso de preservación usado (tratamiento térmico, refrigeración, irradiación); factores intrínsecos (componentes del alimento, flora microbiana, actividad de agua, pH, presencia de otros aditivos). Todos estos factores pueden actuar en forma sinérgica, antagónica o aditiva con los sorbatos y la complejidad de estas interacciones en alimentos hace difícil estimar o predecir la contribución del sorbato en la inhibición.

a) Influencia de los componentes del alimento

Dado que la solubilidad, distribución y partición de los sorbatos en un alimento depende de la composición del producto, la acción antimicrobiana también se verá influenciada por ella.

En comparación con otros preservadores, los sorbatos poseen un coeficiente de partición lípidos/agua más favorable, razón por la cual son empleados en la elaboración de mayonesas, margarinas y aderezos.

La presencia de ácidos en el alimento disminuye la solubilidad de los sorbatos en agua, pero mejora la capacidad antimicrobiana al aumentar la fracción de ácido no disociado. Además, el tipo de ácido también tiene incidencia sobre el efecto antimicrobiano (Liewen y Marth, 1985). Por ejemplo, el ácido cítrico y el láctico incrementan la actividad antimicrobiana en mayor grado que los ácidos inorgánicos (Smittle y Flowers, 1982; Restaino y col., 1982).

b) Influencia de la microflora

En general, el tipo y la cantidad de microorganismos presentes en el alimento afectan la capacidad antimicrobiana de los sorbatos. Esta siempre se ve disminuida por altos niveles de contaminación.

c) Influencia de la actividad de agua

En general, la acción inhibitoria de los antimicrobianos se incrementa si se deprime la actividad de agua del producto. Así, el empleo de solutos como NaCl y sacarosa, aumentan la acción antimicrobiana de los sorbatos, a pesar de que estos reducen la solubilidad del ácido sórbico en agua y elevan el coeficiente de partición lípidos/agua.

En algunos casos, la adición de NaCl o sacarosa reduce el efecto antimicrobiano de este preservador. Por ejemplo, las células de *S. typhimurium* en un sistema constituido por soja y almidón permanecen viables durante más tiempo a a_w 0,79 que a a_w 0,97 (Beuchat, 1981).

d) Influencia del pH

Es un hecho establecido que la actividad antimicrobiana del ácido sórbico, como la de otros ácidos lipofílicos débiles, se incrementa cuando el pH del sustrato disminuye. La acción antimicrobiana se asocia a la forma no disociada del ácido y se considera que la forma aniónica es inefectiva (Lueck, 1980).

Los sorbatos presentan la ventaja de ser efectivos aún en el rango de pH comprendido entre 6,0 - 6,5, a diferencia de otros preservadores, como el propionato y el benzoato cuyo pH máximo para inhibir el crecimiento microbiano es 5,0 - 5,5 y 4,0 - 4,5, respectivamente (Sofos y Busta, 1981).

El preservador es inefectivo a pH 7,0 o mayor (Smoot y Pierson, 1981; Sedward y col., 1982; Sofos, 1983).

e) Influencia del grado de disociación

Como se mencionó en el párrafo anterior, la acción antimicrobiana del ácido sórbico depende del grado de disociación del ácido y éste es función del pH del sistema (Tabla 1.11) y está influenciado por la solubilidad en agua y la actividad de agua. Por ende, para poder

predecir la efectividad del sorbato en un alimento, se debe conocer el pH, la solubilidad y la constante de disociación en ese particular alimento.

Tabla 1.11: Grado de disociación del ácido sórbico en función del pH (Sofos y Busta, 1981).

pH	Acido no disociado (%)
7,00	0,6
6,00	6,0
5,80	7,0
5,00	37,0
4,75	50,0
4,40	70,0
4,00	86,0
3,70	93,0
3,00	98,0

La información acerca de los valores de la constante de disociación en presencia de distintos solutos es limitada, con excepción del caso de soluciones glicerol - agua (Pethybridge y col., 1983). En base a los datos reportados, no se observa un gran cambio en el grado de disociación en el rango de actividad de agua entre 0,8 -1,0.

Algunos estudios han concluido que la forma disociada del ácido tiene capacidad antimicrobiana, pero ésta es de 10 a 600 veces menor que la de la forma no disociada. Sin embargo, a pH 6,0 o mayor más del 50 por ciento de la acción inhibitoria se debe a la forma disociada (Eklund, 1983).

f) Influencia de los aditivos

Diferentes estudios indican que los distintos aditivos normalmente incorporados en los alimentos afectan la acción antimicrobiana de los sorbatos.

El tipo de ácido agregado, no sólo ejerce su efecto por modificar el pH, sino que también hay una acción específica del anión (Juven, 1976). La inactivación de *Salmonella typhimurium* por acción del sorbato es mayor en presencia de ácido acético que de láctico (Park y Marth, 1970). El tipo de alimento también puede modificar el efecto del acidificante sobre el sorbato, por ejemplo, el ácido cítrico incrementa la acción antimicrobiana del sorbato en pavo y, en cambio, no ejerce ningún efecto en salchichas de pollo (Huhtanen, 1980).

En general, los ácidos cítrico y láctico potencian la capacidad antimicrobiana de los sorbatos en mayor medida que otros ácidos.

Para impedir la oxidación de lípidos y el desarrollo de rancidez se adicionan antioxidantes. Los más utilizados son butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxiquinona (BHQ) y propilgalato (PG). Se encontraron efectos sinérgicos de estos aditivos con los sorbatos (Robach y Stateler, 1980).

Ciertos estudios indican que la interacción de los sorbatos con los fosfatos mejora la capacidad antimicrobiana de los primeros. Ivey y Robach (1978) reportaron que tanto el pirofosfato ácido de sodio como el hexametáfosfato de sodio mejoran la acción de los sorbatos en la inhibición del *Clostridium botulinum* en carne de cerdo enlatada.

Svorcova (1980) reportó que el ácido sórbico y el ascórbico en combinación resultan más efectivos que cada uno de ellos por separado en la preservación de jugos de frutas.

En la literatura se citan numerosas patentes que proponen el uso de distintos aditivos en combinación con los sorbatos para lograr la estabilidad microbiológica de distintos productos.

g) Influencia del método de preservación empleado

Los sorbatos pueden interactuar con el tratamiento térmico y afectar la latencia de las esporas, la velocidad y la extensión de la destrucción térmica y la recuperación de las esporas dañadas por acción del calor.

Bajos niveles de sorbatos (0,01 %) podrían estimular la ruptura del estado de latencia de las esporas en el transcurso del tratamiento térmico, esto se observó en ascosporas de *Byssochlamys nivea* en jugo de pomelo (Beuchat, 1976).

En general, el tratamiento térmico y los sorbatos actúan sinérgicamente en la inactivación por calor de hongos, levaduras y bacterias. (Sofos, 1989).

En algunos estudios se ha sugerido que el uso combinado de bajas dosis de irradiación y la adición de sorbatos permiten aumentar la vida útil de diversos alimentos ya que ambos factores de preservación actúan sinérgicamente en la inhibición de microorganismos (Sofos, 1989). Sin embargo, debido a que la irradiación y el tratamiento térmico afectan la estabilidad del sorbato, más estudios son necesarios para conocer las ventajas y desventajas de esta combinación de tratamientos.

h) Influencia de las condiciones de almacenamiento

Numerosos estudios han demostrado que los sorbatos inhiben a los microorganismos más efectivamente a bajas temperaturas de almacenamiento (Pederson y col., 1961). La combinación de sorbatos y nitrito posee una mayor capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano en salchichas a 7-9 °C que a 20 °C. Además la inhibición de la toxina botulínica en homogenatos de cerdo es más pronunciada a 15 °C que a 35 °C (Roberts y col., 1982).

La acción antimicrobiana de los sorbatos es también influenciada por el tipo de envase y la atmósfera gaseosa que rodea al producto. En general, tanto el envasado al vacío como el uso de atmósfera modificada (aumento del nivel de CO₂) mejoran el efecto inhibitorio de los sorbatos. Varios estudios han demostrado que la combinación de dióxido de carbono y sorbatos es una efectiva inhibidora del desarrollo microbiano (Liewen y Marth, 1985).

1.2.5 - Aplicaciones de los sorbatos

Los sorbatos son empleados como antimicrobianos en una amplia gama de alimentos tal como se aprecia en la Tabla 1.12, entre las aplicaciones comerciales más importantes se incluyen: productos lácteos (quesos, yogurt, crema ácida), productos de panadería (tortas, mezclas para tortas, tartas, rellenos para tartas), productos frutihortícolas (jugos de frutas, jaleas, frutas secas, mermeladas, vegetales fermentados), bebidas alcohólicas, mayonesas, margarinas, aderezos, productos cárnicos. También son usados en la preservación del tabaco, adhesivos y en la industria cosmética (Lueck, 1976; Sofos y Busta, 1981).

1.2.5.1 - Aplicaciones de los sorbatos, con especial referencia a productos cárnicos

El uso más frecuente de los sorbatos es en productos cárnicos, a través de su adición superficial a embutidos crudos para evitar el crecimiento de hongos durante el proceso de secado (Chichester y Tanner, 1972; Leistner, 1975).

Tabla 1.12: Aplicaciones comerciales del sorbato de potasio y su concentración recomendada (Sofos, 1989).

Producto	cantidad adicionada (%)
Productos lácteos	0,05 - 0,30
Productos de panadería	0,03 - 0,30
Vegetales	0,02 - 0,20
Frutas	0,02 - 0,25
Bebidas	0,02 - 0,10
Emulsiones	0,05 - 0,10
Carne y pescado	0,05 - 0,30
Otros	0,05 - 0,30

El uso de sorbatos en carnes es más común en algunos países. Por ejemplo, en Japón, este preservador es el más ampliamente utilizado (Leistner, 1975). Por otra parte, en diferentes trabajos de investigación y patentes se recomienda el uso de sorbato de potasio como ingrediente en la formulación de distintos productos cárnicos, a fin de inhibir el crecimiento de hongos, levaduras, bacterias patógenas y causantes de deterioro.

En carnes vacunas de humedad intermedia, el Código Alimentario Argentino permite la adición de 0,16 % (m/m) de sorbato de potasio.

Numerosos trabajos indican que el sorbato de potasio solo o en combinación con bajos niveles de nitrito de sodio inhibe el crecimiento de *C. botulinum* (Sofos y Busta, 1981), siendo un sustituto adecuado para disminuir el contenido de nitrito en las carnes curadas.

1.2.5.2 - Aplicaciones en productos farmacéuticos y cosméticos

Debido a la baja toxicidad de los sorbatos, su alta tolerancia por la piel y su relativamente alto coeficiente de partición entre la fase lipídica y acuosa, dicho preservador es adecuado para emulsiones farmacéuticas y cosméticas que sean propensas al desarrollo de hongos y levaduras.

Entre los productos farmacéuticos, en los que se utilizan sorbatos como preservadores se encuentran: drogas de uso oral, soluciones para inyectables, cremas, desinfectantes para lentes de contacto (Kirchoff, 1975; Lenard, 1978; Dai, 1981).

1.2.5.3 - Aplicaciones en otras industrias

Entre las aplicaciones industriales de los sorbatos se incluye su uso en la fabricación de tabaco, gomas, adhesivos, tripas para embutidos, fertilizantes, desodorizantes, pesticidas, pinturas. En algunos casos, además de actuar como antimicrobianos, su adición brinda algunas otras ventajas. Por ejemplo en productos plásticos posee propiedades antioxidantes (Lueck, 1976).

1.2.5.4 - Métodos de aplicación

Los sorbatos se pueden adicionar a los alimentos o a otros productos ya sea como aditivos en la formulación del producto o mediante la pulverización o inmersión del producto en una solución de sorbato, o bien a través del material de empaque. La selección del método de aplicación depende del tipo de producto, el objetivo, el proceso de fabricación y el equipamiento disponible.

En la elaboración de determinados quesos, por razones tecnológicas, no es posible adicionar el sorbato a la cuajada, ya que éste retardaría la coagulación de la leche. En este caso, la adición del sorbato se realiza en la superficie del queso, que es la zona más propensa al desarrollo de hongos.

Cuando se selecciona un método de aplicación, deben tenerse en cuenta las propiedades químicas de los sorbatos, tales como la solubilidad y volatilidad. Si el producto va ser sometido a un tratamiento térmico durante su procesamiento, pueden producirse pérdidas del preservador, ya que el mismo se volatiliza por encima de 60 °C.

Cuando se aplica el sorbato mediante pulverización o inmersión, se deben utilizar soluciones con una concentración tal que, luego del proceso de difusión, el contenido de sorbato en el alimento sea el deseado.

1.2.6 - Toxicidad de los sorbatos

Los sorbatos son considerados como aditivos "Gras" ("Generally recognized as safe", o sea, generalmente reconocidos como seguros). Esto se basa en los numerosos estudios que se han realizado para establecer su inocuidad.

La dosis letal 50 (LD₅₀) del ácido sórbico se encuentra en el rango entre 7,4 a 10 g/kg de peso y para el sorbato de potasio es de 5,9 a 7,2 g/kg de peso. A modo de comparación, la LD₅₀ para el NaCl es de 5 g/kg de peso. Además, la toxicidad aguda del sorbato no se incrementa por la presencia de otros preservadores. En base a lo mencionado, se pudo concluir que los sorbatos se encuentran entre los aditivos menos tóxicos (Dewel y col., 1954).

Diferentes estudios realizados con ratones, ratas, conejos y perros a los que fueron suministrados niveles de sorbatos del 1 al 10 % en la dieta durante 3 meses, mostraron que ellos no provocan efectos adversos en la salud de los animales, en relación al grupo

control (Dewel y col., 1954; Demaree y col, 1955; Sado, 1974). En algunos estudios, se observó un agrandamiento del hígado de los animales alimentados con sorbato. Sin embargo, los análisis histopatológicos indicaron que el hígado era normal y se interpretó que el fenómeno observado era ocasionado por una hipertrofia funcional relacionada a la metabolización de los sorbatos como fuente calórica (Smyth y Carpenter, 1948).

La alimentación de ratas con una dieta que contenía un 5 % de ácido sórbico a lo largo de toda su vida no mostró efectos negativos sobre la salud, en relación al grupo control. Sin embargo, se observó un mayor aumento de peso y una menor mortalidad. Estos efectos se atribuyeron al suplemento calórico proporcionado por el sorbato. Tampoco se observaron efectos adversos en la capacidad reproductiva (Lang, 1980).

En general, la adición de sorbato en la dieta de animales no produce efectos teratogénicos ni carcinogénicos (Dinermancy y Ignat'ev, 1967; Gaunt y col, 1975; Hendy y col, 1976).

1.2.6.1 - Metabolismo de los sorbatos

Dado que el ácido sórbico es un ácido carboxílico alifático, éste puede ser metabolizado por los animales de manera similar a otros ácidos grasos. En la Figura 1.2, se esquematiza el metabolismo de degradación del ácido sórbico.

En forma similar al metabolismo de los ácidos grasos, la degradación de los sorbatos involucra la activación de la coenzima A, hidratación para formar un β -hidroxiácido; deshidrogenación, para formar un β -cetoácido y la oxidación y ruptura por acción de la β -cetotiolasa para formar un mol de ácido hexanoico, dióxido de carbono y agua. (Dewel y col., 1954). En casos en que la concentración de sorbatos es elevada, ocurre una ω -oxidación, similar a la de otros ácidos grasos (Dewel y col., 1954; Lueck, 1980).

Estudios realizados *in vitro* han demostrado que el ácido sórbico, produce al metabolizarse, 6,6 kcal/g, de las cuales un 50 % es biológicamente disponible.

La degradación del ácido sórbico en animales, en presencia de carbohidratos produce energía, dióxido de carbono y agua. Sin embargo, en ausencia de hidratos de carbono se producen acetoacetona y acetona (Dewel y col., 1954).

Figura 1.2: Metabolismo de degradación del ácido sórbico (Sofos, 1989).

Etapas de la reacción y productos		Enzimas
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$	ácido sórbico	
↓ + H ₂ O	↓ Hidratación	enolhidratasa
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CHOH-CH}_2\text{-COOH}$	β-hidroxi-ácido	
↓ - 2 H	↓ Deshidrogenación	β-ceto-hidratasa
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CO-CH}_2\text{-COOH}$	β-ceto-ácido	
↓ + O ₂	↓ Oxidación	β-ceto-tiolasa
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-COOH} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	ácido graso + dióxido de carbono + agua	
↓ + H ₂ O	↓ Hidratación	enol-hidratasa
$\text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_2\text{-COOH}$	β-hidroxi-ácido	
↓ - 2 H	↓ Deshidrogenación	β-ceto-hidratasa
$\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-COOH}$	β-ceto-ácido	
↓ + 2 O ₂	↓ Oxidación	β-ceto-tiolasa
$2\text{CO}_2 \quad \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{-COOH}$	↓ productos finales	

El proceso de descomposición se estudió *in vitro*, empleando ácido sórbico marcado con carbono-14. Los resultados indicaron que el preservador es casi totalmente absorbido por el hígado y un 85 % del total se oxida en unas pocas horas. La vida media depende de la dosis inicial y es de, aproximadamente, 40 a 110 minutos (Lueck, 1976; Fingerhurt y col., 1962).

Algunos estudios han reportado que los sorbatos tienen la capacidad de inhibir diferentes enzimas, sin embargo, no parece probable que con los niveles de sorbatos usados en alimentos puedan tener lugar reacciones de inhibición enzimática (Melnick y col., 1954).

1.2.6.2 - Reacciones alérgicas potenciales provocadas por los sorbatos

El uso de sorbatos en productos cosméticos y farmacéuticos, en general, produce riesgos mínimos de reacciones alérgicas en la piel. Estas, solamente se han observado en individuos particularmente sensibles (Lueck, 1976).

En alimentos, la información sobre problemas alérgicos relacionados con el uso de sorbatos es escasa y está circunscripta al uso combinado de sorbatos y nitrito en tocino y los estudios realizados reportan resultados contradictorios (Paquette y col., 1980).

1.2.6.3 - Potencial mutagénico de las interacciones sorbatos-nitrito

A pesar de que el ácido sórbico es considerado un aditivo no tóxico, existen evidencias de que la presencia conjunta de sorbatos y nitrito conduce a la formación de compuestos mutagénicos. Como se mencionó previamente, los sorbatos pueden reaccionar con el nitrito (ver sección 1.2.2.2 d). En este caso, es importante evaluar la viabilidad de esta reacción en un producto comercial, teniendo en cuenta la concentración de los distintos aditivos, el pH del sistema, la influencia de otros componentes del alimento y el proceso de elaboración del producto.

1.2.6.4 - Efecto de los sorbatos sobre la formación de nitrosaminas

En las carnes curadas, bajo ciertas condiciones, como por ejemplo durante el fritado del tocino, el nitrito reacciona con las aminas secundarias o terciarias presentes en la carne, conduciendo a la

formación de nitrosaminas potencialmente carcinogénicas. Por esta razón, se ha tratado de reducir el tenor de nitrito agregado a carnes curadas reemplazándolo parcialmente por sorbato, ya que estos inhiben al *Cl. botulinum*.

Se han realizado diferentes trabajos para establecer el efecto del sorbato sobre la formación de nitrosaminas (Robach y col., 1980). Los resultados obtenidos indican que el sorbato *per se* no posee un efecto inhibitorio sobre la formación de nitrosaminas. Simplemente, su presencia permite disminuir el tenor de nitrito y, por ende, la formación de dichos compuestos.

2 - OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el estudio de la estabilidad del ácido sórbico en sistemas modelo acuosos y en carnes de alta actividad de agua a fin de establecer cuáles son las condiciones que minimizan la destrucción de este preservador y, por ende, aseguran la estabilidad microbiológica y organoléptica del alimento.

A los efectos de lograr el objetivo propuesto el estudio realizado comprendió las siguientes etapas:

* Puesta a punto de métodos que permitieran cuantificar la destrucción de los sorbatos en sistemas modelo acuosos y en homogenatos cárnicos.

* Análisis de la estabilidad de los sorbatos en sistemas modelo acuosos.

Se estudió la influencia de distintos factores en la cinética de destrucción del sorbato y su efecto sobre el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático.

Los factores estudiados fueron :

- Temperatura de almacenamiento.
- pH.
- Acido usado para regular el pH.
- Depresión de la actividad de agua a 0,91 y del humectante usado para ello.
- Material de empaque.
- Presencia de distintos aditivos (EDTA, propilgalato, polifosfatos, nitrito de sodio, sacarosa, ácido ascórbico).

* Análisis de la estabilidad de los sorbatos en homogenatos cárnicos.

Se estudió la influencia de distintos factores sobre la cinética de destrucción del sorbato de potasio.

Los factores estudiados fueron :

- Temperatura de almacenamiento.
- pH.
- Acido usado para regular el pH.
- Humectante usado para ajustar la actividad de agua a 0,91.
- Cocción.
- Atmósfera de almacenamiento.
- Presencia de distintos aditivos (polifosfatos, nitrito de sodio, sacarosa, ácido ascórbico).

A fin de facilitar la comprensión de los temas tratados se presenta cada uno de ellos en forma separada.

3 - PUESTA A PUNTO DE LOS METODOS DE DOSAJE DE ACIDO SORBICO

3.1 - INTRODUCCION, p. 57

- 3.1.1 Métodos de análisis, p. 57
- 3.1.1.1 Métodos de extracción, p. 57
- 3.1.1.2 Métodos de cuantificación, p. 59

3.2 - OBJETIVOS, p. 64

3.3 - MATERIALES Y METODOS, p. 65

- 3.3.1 Técnicas ensayadas, p. 65
- 3.3.1.1 Método de oxidación de la A.O.A.C (I), p. 65
- 3.3.1.2 Método de extracción con éteres mezclados y medición espectrofotométrica (II), p. 69
- 3.3.1.3 Método de destilación y medición espectrofotométrica (III), p. 70
- 3.3.1.4 Método de extracción etérea y medición espectrofotométrica (IV), p. 72
- 3.3.1.5 Técnica propuesta para el dosaje de sorbatos en homogenatos cárnicos (V), p. 74
- 3.3.1.6 Técnica de cromatografía líquida de alta presión (VI), p. 75
- 3.3.2 Sistemas utilizados, p. 77
- 3.3.2.1 Sistemas modelo acuosos, p. 78
- 3.3.2.2 Homogenatos cárnicos, p. 80
- 3.3.3 Análisis estadístico, p. 81

3.4 - RESULTADOS Y DISCUSION, p. 82

- 3.4.1 Evaluación de los métodos I a IV y VI en soluciones acuosas de sorbato de potasio, p. 82
- 3.4.2 Evaluación de los métodos I y VI en presencia de nitrito de sodio, p. 83
- 3.4.3 Evaluación de los métodos I y VI en presencia de glicina, p. 84
- 3.4.4 Evaluación de los métodos I a IV y VI en homogenatos cárnicos, p. 86

3.5 - CONCLUSIONES, p. 89

3 - PUESTA A PUNTO DE LOS METODOS DE DOSAJE DE ACIDO SORBICO

3.1 - INTRODUCCION

3.1.1 - Métodos de análisis

Para la determinación cuali y cuantitativa del ácido sórbico en alimentos se han aplicado diferentes métodos analíticos, entre los que se incluyen métodos acidimétricos, colorimétricos, espectrofotométricos y cromatográficos.

La mayor parte de los métodos cuantitativos requieren la extracción previa del ácido sórbico contenido en el alimento. Esto se debe a que está presente en baja concentración y, además, los otros constituyentes del alimento pueden interferir en su dosaje.

El proceso de extracción se puede realizar mediante la aplicación de diversas técnicas, destilación por arrastre con vapor, diálisis, extracción con solventes, etc.

La mayor parte de los métodos analíticos que se aplican son inespecíficos y, por lo tanto, pueden estar afectados por los componentes del alimento y por los productos formados durante el almacenamiento de los mismos.

3.1.1.1 - Métodos de extracción

Los principales métodos empleados para la extracción de este preservador son:

- a) Destilación por arrastre con vapor.
- b) Extracción con solventes.
- c) Filtración.
- d) Extracción por métodos combinados.

a) Destilación por arrastre con vapor

Esta técnica ha sido ampliamente usada para la separación del ácido sórbico previo a su determinación cuantitativa y se basa en la volatilidad del preservador, el cual es arrastrado por el vapor. Se debe trabajar en condiciones ácidas y con un alto contenido de sales para lograr una eficiente extracción. Entre los distintos ácidos y sales usados para este propósito, se encuentran, el tartárico (Terada y col., 1979; Werner y Jensen, 1981), fosfórico y sulfúrico; sulfato de magnesio heptahidratado y sulfato de sodio (A.O.A.C, 1980).

La destilación por arrastre con vapor ha sido usada como método de extracción en numerosas técnicas espectrofotométricas (Melnick y Luckmann, 1954; Werner y Jensen, 1981; Di Sipio, 1992), colorimétricas (Pekkarinen, 1964), cromatográficas (Stafford y Black, 1978; Brunnemann, 1980). Se ha aplicado para la extracción de ácido sórbico de quesos (Melnick y Luckmann, 1954; Werner y Jensen, 1981), productos de panadería, vino frutas y vegetales (Di Sipio, 1992; Gerschenson y col., 1986), entre otros.

Sin embargo, esta técnica de extracción es lenta y ciertas sustancias volátiles presentes en el alimento o bien generadas por la descomposición de algunos compuestos, pueden interferir en el posterior dosaje del preservador. Entre las sustancias que causan interferencias se encuentran los compuestos aromáticos presentes en frutas y vegetales (Mandrou y col., 1977), los compuestos volátiles formados que absorben en la región ultravioleta del espectro y los compuestos formados por el nitrito de sodio con los compuestos alifáticos presentes durante la destilación por arrastre con vapor (Zipser y Watts, 1962).

Con el objetivo de eliminar interferencias y mejorar la eficiencia de la extracción, se han sugerido diferentes modificaciones. Por ejemplo, en el caso de vinos y jugos de frutas se sugiere la adición previa de dinitrofenilhidracina para destruir a los aldehídos que, de lo contrario, interferirían en el posterior dosaje colorimétrico (Harrington y col., 1962).

b) Extracción con solventes

Diferentes solventes han sido usados para la extracción del ácido sórbico: éter, cloroformo, metanol, etanol, isooctano, entre otros.

Sin embargo, el más frecuentemente empleado es el éter etílico o bien la mezcla de éter etílico y éter de petróleo en igual proporción. En este caso, las muestras se acidifican con ácido

clorhídrico (Geahchan, 1979) o acético (Ciaccio, 1966) previo a la extracción. Este solvente ha sido empleado para la extracción de ácido sórbico de frutas, vino, salsa de soja, mayonesa (Sofos, 1989).

El metanol y etanol se han empleado para la extraer el preservador de carnes, salsas, aderezos, productos lácteos (Alí, 1985; Park y Nelson, 1981).

c) Filtración

La filtración es una técnica sencilla que se ha empleado en alimentos líquidos en reemplazo de la destilación por arrastre con vapor con la finalidad de evitar la formación de compuestos que absorben al ultravioleta, los cuales interferirían en el dosaje espectrofotométrico. Ha sido empleada para la extracción de sorbatos de jugos de fruta (Sofos, 1989).

d) Extracción por métodos combinados

En general, estos métodos se aplican con el objetivo de eliminar interferencias. En el caso de vinos, se realiza una extracción con éter sobre el destilado obtenido por arrastre con vapor (Sofos, 1989).

Para la determinación simultánea de ácido sórbico y benzoico se sugiere realizar una filtración seguida por una extracción con una mezcla de ácido perclórico al 1% e isopropanol al 18 %. Una vez extraídos ambos preservadores, el dosaje se realiza por cromatografía líquida de alta presión.

3.1.1.2 - Métodos de cuantificación

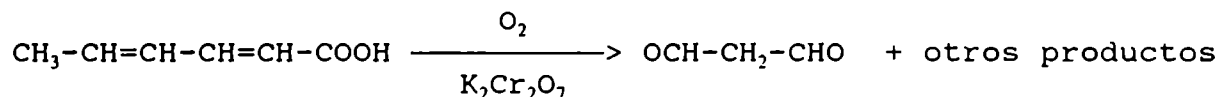
Los métodos analíticos más empleados son:

- a) colorimétricos
- b) espectrofotométricos
- c) cromatográficos (cromatografía gaseosa, líquida de alta presión, en capa delgada)
- d) microbiológicos (cualitativo)

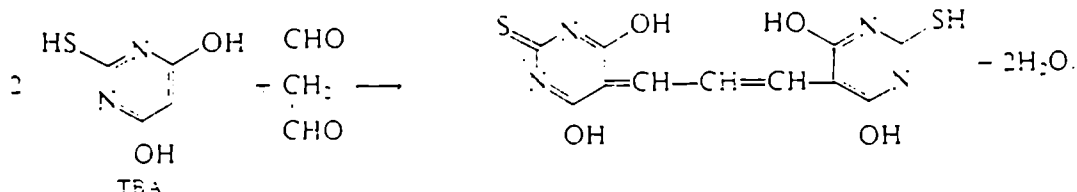
a) Método colorimétrico

El método colorimétrico es la primera técnica oficial recomendada por la A.O.A.C para el dosaje de sorbato en vinos y quesos.

Esta técnica consiste en una extracción del preservador, mediante una destilación por arrastre con vapor, seguida de su oxidación a malonaldehído por acción del dicromato de potasio en medio ácido:



Luego se adiciona ácido tiobarbitúrico, el cual reacciona con el malonaldehído, formándose un pigmento rosado cuya absorbancia se determina colorimétricamente a 532 nm (A.O.A.C, 1980):



La reacción colorimétrica mencionada es muy sensible y permite cuantificar bajas concentraciones de ácido sórbico del orden de 1 mg/l en el destilado (Lueck, 1976). Sin embargo, se ha reportado que esta técnica puede presentar algunas interferencias debido a la presencia de componentes (ácidos grasos, compuestos volátiles) que den color al ser tratados con el ácido tiobarbitúrico y se aconseja hacer un ensayo previo para descartar posibles interferencias. Este consiste en adicionar ácido tiobarbitúrico al destilado, sin realizar la oxidación con dicromato de potasio, de manera tal de comprobar si compuestos presentes en el destilado dan positiva la reacción con ácido tiobarbitúrico. En caso afirmativo, se debe hacer un tratamiento previo del destilado para eliminar los interferentes (Pekkarinen, 1964).

El método colorimétrico ha sido usado para el dosaje de sorbatos en frutas (García y col., 1993; Díaz de Tablante y col., 1993), quesos (Willamoswki, 1971), sistemas modelo acuosos (Gerschenson y col., 1986 y 1987).

Roy y col. (1976) han sugerido el empleo de una membrana para la difusión de gases, en reemplazo de la destilación por arrastre con vapor, con el objetivo de disminuir el tiempo necesario para el análisis.

b) Método espectrofotométrico

Este método fue desarrollado por Melnick y Luckmann en 1954 y luego fue modificado por Alderton y Lewis (1958). Es la técnica recomendada por la A.O.A.C para el dosaje de sorbatos en productos cárnicos.

El método espectrofotométrico se basa en una extracción del preservador con un solvente, luego de la cual se mide la absorbancia del extracto en la zona ultravioleta del espectro. La misma se debe a la presencia de dobles enlaces en la molécula de ácido sórbico. La longitud de onda a la cual la absorbancia es máxima depende del pH y del tipo de solvente usado en la extracción y, en general, se encuentra en el rango comprendido entre 250 - 290 nm (Werner y Jensen, 1981; Stafford, 1976; Willamowski, 1974; Maxstadt, 1972).

Este método no es específico y, por ende, muchos compuestos que presentan absorbancia en el ultravioleta, interfieren. Debido a esto, se han propuesto diferentes modificaciones (Ciaccio, 1966; Willamowski, 1974; Maxstadt, 1972; Holley y Millard, 1980).

c) Métodos cromatográficos

*** Cromatografía gaseosa**

A diferencia de los métodos comentados previamente, el análisis por cromatografía gaseosa es rápido, simple, preciso y, fundamentalmente, no presenta problemas de interferencias por parte de otros componentes del alimento (Bolin y Stafford, 1984). Es el método recomendado por la A.O.A.C para la determinación simultánea de ácido sórbico y benzoico.

La cromatografía gaseosa se ha empleado para el dosaje de ácido sórbico en quesos, frutas deshidratadas (Stafford y Black, 1978), bebidas carbonatadas y jugos de frutas (Bolin y Stafford, 1984), carnes frescas (Robach y Ivey, 1978).

Entre las técnicas de extracción empleados previo al dosaje se incluyen, extracción con solventes, destilación y procedimientos combinados.

En general, para la determinación del sorbato por cromatografía gaseosa se utilizan columnas de vidrio rellenas con Chromosorb. Como gas transportador se emplea nitrógeno a un flujo de 30 - 40 ml/min o helio a un flujo de 35 ml/min. La detección se realiza mediante un detector de ionización de llama. La temperatura de la columna se eleva de 130 a 250 °C a una velocidad de 6 °C/min. La cuantificación

se realiza en base a un estándar interno, por ejemplo ácido propanoico, hexanoico, decanoico (Sofos, 1989).

Mediante cromatografía gaseosa se ha determinado simultáneamente ácido sórbico, benzoico, parabenos, ácido salicílico y sacarina (Zygmunt, 1979; Larsson, 1983; Coehlo y Nelson, 1983).

* Cromatografía líquida de alta presión

La cromatografía líquida de alta presión, en el caso de algunos alimentos líquidos tales como cerveza y vinos (Bui y Cooper, 1987), presenta la ventaja de poder ser aplicada en forma directa, sin la necesidad de un proceso de extracción previo.

Mediante esta técnica se obtiene un alto porcentaje de recuperación del preservador (Bui y Cooper, 1987) y, en general, sus resultados están en concordancia con los obtenidos mediante el método espectrofotométrico de la A.O.A.C (McCalla y col., 1977; Brunnermann, 1980).

Entre los productos analizados por esta técnica se encuentran: margarina, mayonesa, productos de panadería, jugos, vinos, productos lácteos, carnes (Robach y col., 1980; Eisenbeiss, 1977; McCalla y col., 1977).

Este método permite la determinación simultánea de ácido sórbico, benzoico y parabenos; ácido sórbico, benzoico y ascórbico; ácido sórbico, benzoico y sacarina (Bui y Cooper, 1987; Sofos, 1989).

Diferentes tratamientos se han usado para la preparación previa de la muestra: destilación por arrastre con vapor, centrifugación, extracción con metanol.

Como fase estacionaria, en general, se emplean columnas empacadas con rellenos de C-18, las cuales se eluyen con mezclas de metanol-buffer a un flujo de aproximadamente 1 ml/min. El preservador se detecta por espectrometría U.V a una longitud de onda entre 225 a 258 nm. En general, se obtiene una recuperación de 92 - 101 %.

* Cromatografía en capa delgada

Esta técnica ha sido usada para la detección semicuantitativa del ácido sórbico en productos de panadería, carnes, vinos, jugos de fruta (Sofos, 1989).

Para la determinación cuantitativa, se emplean estándares de ácido sórbico de diferentes concentraciones, los cuales se comparan con las manchas obtenidas. La mínima cantidad detectable se encuentra en el rango de 0,01 a 1,0 μg /mancha y depende del tipo de técnica de detección empleada, del solvente y del alimento. En general, se obtienen recuperaciones del orden del 90 % (Sofos, 1989).

d) Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos se basan en la inhibición del crecimiento microbiano por adición de sorbato. Esta se detecta por la disminución en el tamaño de las colonias o bien, por la ausencia de producción de dióxido de carbono en el caso de cepas que produzcan este compuesto. Entre los microorganismos usados en la aplicación de esta técnica se encuentran: levaduras (*Saccharomyces cereviseae*, *Rhodotorula rubra*), hongos (*Aspergillus niger*) (Sofos, 1989).

3.2 - OBJETIVOS

En este capítulo se analizará la confiabilidad de distintos métodos analíticos comúnmente empleados en la cuantificación del ácido sórbico a fin de disponer de métodos adecuados para el dosaje del preservador en sistemas modelo acuosos y en homogenatos cárnicos.

3.3 - MATERIALES Y METODOS

Se aplicaron distintas técnicas analíticas para cuantificar el ácido sórbico con el objetivo de hallar métodos adecuados para evaluar la degradación del preservador, tanto en sistemas modelo acuosos como en homogenatos cárnicos.

3.3.1 - Técnicas ensayadas

3.3.1.1 - Método de oxidación de la A.O.A.C (I)

El método de oxidación es el primer método oficial propuesto por la A.O.A.C y es el recomendado para el dosaje de sorbatos en quesos.

* Descripción de la técnica

El método de oxidación (A.O.A.C, 1980, secciones 20.098-20.101) involucra dos etapas:

Primera etapa: consiste en la extracción de los sorbatos, que se realiza mediante una destilación por arrastre con vapor, previa acidificación de la muestra (con la que se desplaza el equilibrio hacia la forma no disociada del ácido que es volátil y se arrastra con vapor).

Segunda etapa: consiste en la oxidación del preservador a malonaldehído por adición de $K_2Cr_2O_7$ en medio ácido. Luego, el malonaldehído se hace reaccionar con ácido tiobarbitúrico formándose un pigmento rojo que se dosa colorimétricamente a 532 nm.

* Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Mallinckrodt).

- H_2SO_4 (96 % m/m, Merck): solución 2 N y 0,3 N

- $K_2Cr_2O_7$ (Merck): se disuelven 1,47 g en agua y se lleva a volumen final de 1000 ml.
- Na OH (97 % m/m, Merck): solución 0,5 N.
- HCl (37 % m/m, Mallinckrodt): solución 0,1 N.
- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A): solución estándar que se obtiene disolviendo 134 mg de sorbato de potasio en agua y llevando a volumen final de 1000 ml con agua destilada. En heladera y al abrigo de la luz, se conserva varios días.
- Acido tiobarbitúrico (Sigma, U.S.A): solución 0,5 % que se obtiene disolviendo 250 mg de ácido tiobarbitúrico en 5,0 ml de solución 0,5 N de NaOH en un matraz de 50 ml. Se coloca el mismo bajo un chorro de agua caliente y se agita hasta completa disolución del ácido; luego se agregan 20 ml de agua destilada y se neutraliza con 3 ml de solución 0,1 N de HCl. Finalmente se lleva a volumen con agua destilada. La solución se debe preparar diariamente. En época invernal, una vez preparada mantener a 20 C para evitar la precipitación del ácido.

* Técnica de medición

-Extracción del ácido sórbico

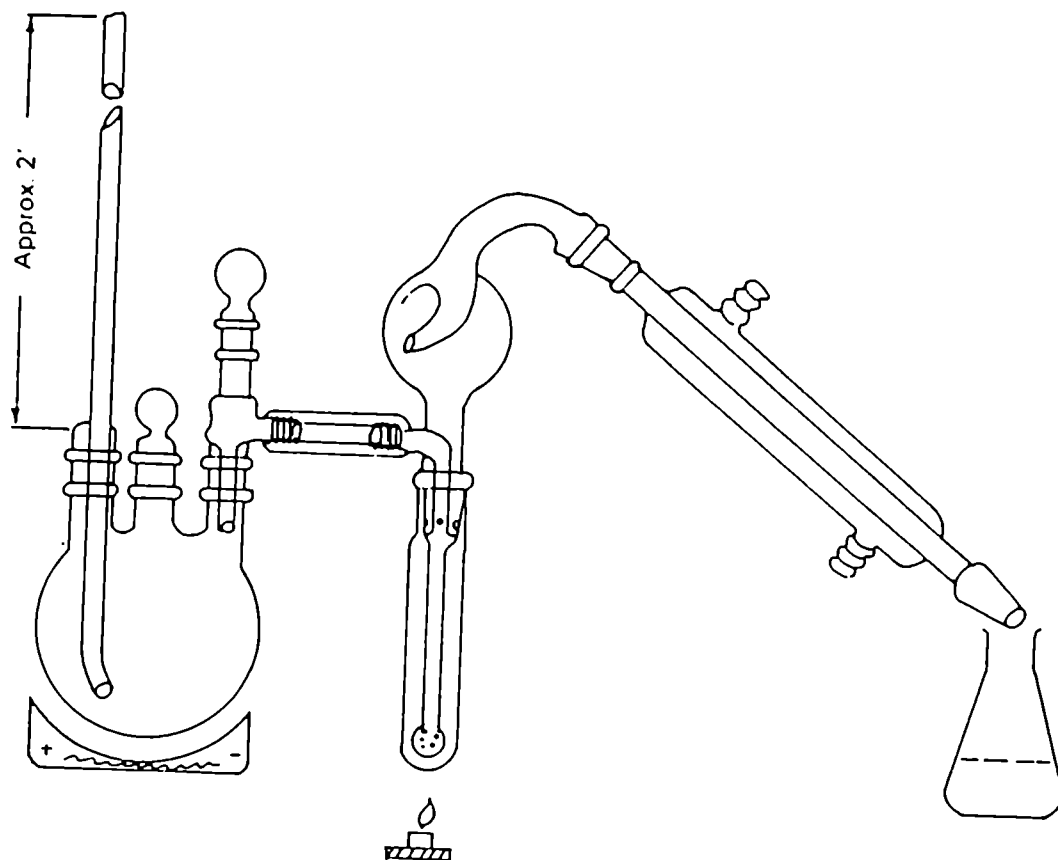
Se pesan entre 1,5 y 2,0 g de muestra y se colocan en el portamuestra. Luego se adiciona al mismo 10 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 10 ml de solución 2 N de H_2SO_4 . El portamuestra se coloca en el equipo esquematizado en la Figura 3.1 para realizar la destilación por arrastre con vapor. Se recogen 200 ml de destilado, el cual se diluye con agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml. Se reserva una alícuota para su posterior dosaje.

En base a las indicaciones mencionadas por la A.O.A.C, sección 20.101, se deben tomar las siguientes precauciones:

- a) Evitar durante la destilación que el volumen de líquido supere el 50 % del volumen total del portamuestra
- b) Evitar que la muestra se carbonice durante la operación de destilación.

Tanto a) como b) se controlan regulando la entrada de gas al mechero colocado por debajo del portamuestra.

Figura 3.1: Esquema del equipo utilizado para la extracción del ácido sórbico mediante destilación por arrastre con vapor (A.O.A.C , 1980)



-Oxidación y medición espectrofotométrica

Una alícuota de 2,0 ml del destilado se coloca en un tubo de ensayo al que se adiciona 1,0 ml de solución 0,3 N de H_2SO_4 y 1,0 ml de solución de $K_2Cr_2O_7$. Se calienta 5 minutos en un baño de agua a ebullición. Se pasa el tubo inmediatamente a un baño de hielo y se le adicionan 2,0 ml de solución de ácido tiobarbitúrico. Se vuelve a calentar a ebullición 10 minutos. Luego se enfría en agua y se mide la absorbancia del complejo rojo formado, a 532 nm, en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch y Lomb, Suiza) contra un blanco de reactivos. La concentración de sorbato de potasio se calcula interpolando la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

* Curva de calibración

Para la preparación de los estándares se toman respectivamente 0,5, 1,0, 2,0, y 3,0 ml de la solución estándar y se lleva a volumen con agua destilada en matraces de 100 ml.

Se pipetea alícuotas de 2,0 ml de cada solución estándar y se colocan en tubos de ensayo. Se procede según lo indicado previamente en la técnica de medición.

Una curva de calibración típica obtenida es la siguiente:

Concentración de ácido sorbico ($\mu g/ml$)	Absorbancia a 532 nm
0,5	0,09
1,0	0,17
2,0	0,33
3,0	0,50

En todas las curvas de calibración realizadas se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,99.

3.3.1.2 - Método de extracción con éteres mezclados y medición espectrofotométrica (II)

Este método es el último método oficial reportado por la A.O.A.C (1980, sección 20.102 - 20.104) y es la técnica recomendada para la cuantificación de sorbatos en productos lácteos frescos.

* Descripción de la técnica

Consiste en una extracción del ácido sórbico con una mezcla de éter de petróleo y éter etílico (proporción 1:1) y una posterior valoración espectrofotométrica a 250 nm.

* Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

- Etanol (Sintorgan).
- HPO_3 (Fluka, Suiza): se disuelven 5 g en 250 ml de agua destilada y se diluye a 1000 ml con etanol.
- Eter etílico (Sintorgan).
- Eter de petróleo para espectrometría ultravioleta (Sintorgan).
- Acido sórbico (Sigma, U.S.A): solución estándar que se obtiene disolviendo 10 mg de ácido sórbico en solución de éteres mezclados y llevando a volumen final de 200 ml con igual diluyente.
- Na_2SO_4 (Anedra).

* Técnica de medición

Se pesan 10,0 g de muestra y se colocan en un erlenmeyer de 125 ml al que se adiciona solución alcohólica de HPO_3 en cantidad suficiente para llevar el volumen total a 100 ml. Luego se agita el sistema con un agitador mecánico durante 1 min e inmediatamente después se filtra a través de papel Whatman nº 3 (embebido previamente en solución de HPO_3 y retirado el exceso del mismo mediante vacío). Se toman 5,0 ml del filtrado y se colocan en una ampolla de decantación de 125 ml a la que se adiciona 50 ml de solución de éteres mezclados; se agita durante 1 min, se descarta la fase acuosa y se agregan 2,5 g de Na_2SO_4 a la fase etérea. Finalmente se determina la absorbancia de la fracción etérea a 250 nm en un

espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch y Lomb, Suiza) contra un blanco de reactivos.

*** Curva de calibración**

Para la preparación de los distintos estándares se toman alícuotas de 1,0, 2,0 y 3,0 ml de la solución estándar y se llevan a volumen con solución de éteres mezclados en matraces de 50 ml. Se mide la absorbancia a 250 nm de cada uno de los estándares contra un blanco de reactivos.

Una curva de calibración típica es la que se detalla a continuación:

Concentración de ácido sorbico (mg/ml)	Absorbancia a 250 nm
0,001	0,24
0,002	0,46
0,003	0,67

En todos los análisis realizados se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,99 para las curvas de calibración.

3.3.1.3 - Método de destilación y medición espectrofotométrica (III)

Esta técnica fue propuesta por Melnick y Luckmann (1954) para el dosaje de sorbatos en quesos.

*** Descripción de la técnica**

Consiste en una destilación por arrastre con vapor realizada en un ambiente de luz tenue, seguida de la medición espectrofotométrica de la absorbancia del destilado a 250 nm.

*** Reactivos**

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Mallinckrodt).

- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A): solución estándar que se obtiene disolviendo 134 mg de sorbato de potasio en agua y llevando a volumen final de 1000 ml con agua destilada. En heladera y al abrigo de la luz, se conserva varios días.

* Técnica de medición

-Extracción del ácido sórbico

La extracción del ácido sórbico se realiza en forma similar a la descrita en la sección 3.3.1.1. En este caso, el proceso de destilación por arrastre con vapor se realiza en un ambiente de luz tenue y el destilado se recoge en un erlenmeyer al que se mantiene a baja temperatura mediante la inmersión en un baño de hielo.

- Medición espectrofotométrica

Se toma una alícuota del destilado y se mide su absorbancia a 250 nm contra un blanco de agua destilada. Previamente se determinó que a esta longitud de onda se presenta el máximo de absorbancia debido a que éste varía con el pH (Melnick y Luckmann, 1954).

* Curva de calibración

Se pipetea alícuotas de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 ml respectivamente de la solución estándar y se lleva a volumen de 100 ml con agua destilada. Se mide la absorbancia de los distintos estándares a 250 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch y Lomb, Suiza) contra un blanco de agua destilada.

Una curva de calibración típica es la detallada a continuación:

Concentración de ácido sórbico ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia a 250 nm
1,0	0,21
2,0	0,42
3,0	0,62
4,0	0,81
5,0	1,00

En todos los análisis realizados se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,99 para la curva de calibración.

3.3.1.4 - Método de extracción etérea y medición espectrofotométrica (IV)

Esta técnica fue propuesta por Ciaccio (1966) para dosar sorbato en aderezos salados de bajas calorías que contienen, además n-propil-p-hidroxibenzoato de calcio.

* Descripción de la técnica

Esta técnica consiste en realizar una extracción con éter en medio ácido del ácido sórbico y del n-propil p-hidroxibenzoato de calcio. Luego de la misma, se realiza la oxidación selectiva del ácido sórbico con permanganato con el objetivo de eliminar su absorción en el ultravioleta. De esta forma, empleando como blanco una alícuota del extracto etéreo oxidado, se puede determinar el contenido de ácido sórbico sin que interfiera el n-propil p-hidroxibenzoato de calcio.

* Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

-H₂SO₄ (96 % m/m, Merck): solución 4,5 M.

-KMnO₄ (Mallinckrodt): solución al 0,5 % (m/v).

-Acido oxálico (Mallinckrodt): solución al 2 % (m/v).

-Buffer de acetato de pH 5,5 (Merck) : se disuelven 34 g de acetato de sodio en agua destilada a 40 - 45 °C, se agrega 15 ml de ácido acético glacial y se lleva a volumen final de 500 ml con agua destilada. Luego se diluye un volumen de la solución con igual volumen de isopropanol. La dilución se realiza a 40 - 45 °C con agitación, para evitar la insolubilización del acetato de sodio.

- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A): solución estándar que se obtiene disolviendo 100 mg de sorbato de potasio en 10 ml de agua y diluyendo a 100 ml con isopropanol. Luego una alícuota de 10 ml de la solución se diluye a 100 ml con solución buffer.

* Técnica de medición

- Extracción

Se pesan los gramos de muestra necesarios como para que en dicha masa haya aproximadamente 3000 μg de sorbato de potasio (1,5 g para alimentos que contienen 2000 ppm del preservador) y se transfieren a una ampolla de decantación. Se adicionan 25 ml de agua destilada, 2 ml de ácido acético glacial y 32 ml de éter etílico. Se agita vigorosamente, se trasvasa el extracto etéreo a un vaso de precipitados. Se realizan otras dos extracciones con éter en la forma mencionada. Se evaporan los extractos etéreos en un baño de agua a 50 °C hasta sequedad. Luego se disuelve el residuo con 5 ml de isopropanol, se transfiere la solución alcohólica formada a un matraz de 50 ml y se lleva a volumen con solución buffer. Se centrifuga la misma a 3000 RPM durante 10 min (centrífuga de mesa, Griffin y George, Londres, Gran Bretaña). Se filtra la solución sobrenadante con papel Whatman nº 42. Una vez filtrada, la solución presenta una ligera coloración y opalescencia que deben desaparecer por la adición de otros reactivos.

- Determinación espectrofotométrica

Se pipetea 5,0 ml de la solución en sendos matraces de 100 ml. A uno de ellos se adiciona 1,0 ml de solución de KMnO_4 , se agita y se deja en reposo 2 min (este lapso de tiempo asegura la completa oxidación del sorbato); luego se agrega 1,0 ml de solución de ácido oxálico y 1,0 ml de solución 4,5 M de H_2SO_4 , se agita y se deja reaccionar 5 min (este lapso de tiempo asegura la reducción del KMnO_4 , que se evidencia por la decoloración de la solución). Al otro matraz se agrega 1,0 ml de solución 4,5 M de H_2SO_4 . Ambos matraces se llevan a volumen con solución buffer. Luego se mide la absorbancia de la muestra sin oxidar en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch y Lomb, Suiza) a 260 nm, usando como blanco la muestra oxidada. Se determinan los μg de sorbato de potasio interpolando la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

* Curva de calibración

Se pipetea 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 ml de la solución estándar de sorbato de potasio en matraces de 100 ml. A cada uno de ellos se adiciona 1,0 ml de solución 4,5 M de H_2SO_4 y se lleva a volumen final con solución buffer. Se mide la absorbancia de cada uno de los estándares en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch y Lomb, Suiza) a 260 nm, usando como referencia, solución buffer.

La curva de calibración debe realizarse diariamente.

Una curva de calibración modelo es la siguiente:

Concentración de sorbato de potasio ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia a 260 nm
1,0	0,14
2,0	0,26
3,0	0,39
4,0	0,51
5,0	0,64

En todos los análisis realizados se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,99 para la curva de calibración.

3.3.1.5 - Técnica propuesta para el dosaje de sorbatos en homogenatos cárnicos (V)

Esta técnica es una modificación del método de oxidación propuesto por la A.O.A.C (1980), sección 20.098 - 20.101.

* Descripción de la técnica

Como se mencionó en la sección 3.3.1.1, el método de oxidación consiste en una extracción del ácido sórbico mediante una destilación por arrastre con vapor, seguida de su oxidación a malonaldehído y una posterior medición espectrofotométrica del pigmento rojo formado entre el malonaldehído y el ácido tiobarbitúrico. En esta técnica modificada, se dispersa la muestra (previo al arrastre con vapor) con arena purificada (proporción homogenato cárnico/arena 1:3) con el objetivo de mejorar la eficiencia de la extracción. Una vez extraído el preservador, su dosaje se realiza en forma idéntica a la propuesta por la técnica de oxidación (A.O.A.C, 1980).

* Reactivos

Además de los reactivos ya mencionados al describir la técnica de oxidación se emplea:

- Antiespumante A-P 20 (Darmex, S.A, Argentina).

- Arena purificada: se coloca arena en un vaso de precipitados y se cubre con solución de HCl al 5 %; se remueve frecuentemente con una varilla de vidrio y se deja actuar a la solución por 12 h. Luego se deshecha la misma y se lava con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado sea el mismo que el del agua destilada. Finalmente se coloca la arena en capas delgadas, en una estufa a 160 °C durante no menos de 5 h. Transcurrido dicho tiempo se envasa en caliente en un recipiente hermético.

* Técnica de medición

-Extracción del sorbato de potasio

Se pesan entre 1,5 y 2,0 g de muestra y se colocan en el portamuestra, luego se adiciona entre 4,5 y 6 g de arena purificada y con la ayuda de una varilla de vidrio se disgrega mecánicamente la muestra. Se adicionan 10 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 ml de solución 2 N de H_2SO_4 y unas gotas de antiespumante. El portamuestra se coloca en el equipo esquematizado en la Figura 3.1, para realizar la destilación por arrastre con vapor.

Los restantes pasos para realizar el dosaje son idénticos a los mencionados previamente en el apartado 3.3.1.1.

3.3.1.6 - Técnica de cromatografía líquida de alta presión (VI)

* Descripción de la técnica

Esta técnica consiste en el dosaje del ácido sórbico por cromatografía líquida de alta presión y emplea como principio de detección la absorción en el ultravioleta del preservador.

* Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A: solución estándar que se obtiene disolviendo 0,0125 g en agua y llevando a volumen final de 500 ml, con igual diluyente. En heladera y al abrigo de la luz, se conserva varios días.

- Metanol calidad HPLC (Sintorgan).

- Agua bidestilada en destilador de vidrio.

* Equipo

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de alta presión en fase líquida, marca Micromeritics (U.S.A) con un detector ultravioleta de longitud de onda variable, un inyector Rheodyne (U.S.A) modelo 7125, un integrador Spectra Physics modelo 2190 (U.S.A.). Se usó una columna Alltech (U.S.A) de C_{18} de partículas de 5μ de diámetro.

* Condiciones de operación

- Longitud de onda empleada para la detección: 254 nm
- Fase móvil: metanol:agua, 70:30
- Flujo: 0,7 ml/min
- Volumen de inyección: 20 μ l
- Velocidad de papel: 0,5 cm/min
- Temperatura: ambiente

* Técnica de medición

a) Sistemas modelo acuosos

Se toma una alícuota de muestra de 50 μ l mediante una micropipeta automática (Socorex, U.S.A) la que se transfiere a un matraz de 25 ml y se lleva a volumen final con fase móvil. Luego se filtra mediante un equipo de filtración (Sartorius, Alemania) provisto de un filtro de nylon 66 con poros de 0,45 μ m de diámetro. Finalmente se inyectan por duplicado las muestras en el equipo, registrándose el área obtenida en cada caso.

b) Homogenatos cárnicos

En el caso de trabajar con homogenatos cárnicos, se debe realizar un proceso de extracción previo del preservador.

- Extracción: se realiza según la técnica propuesta en la sección 3.3.1.5. En este caso, una vez completado el arrastre con vapor se diluye el destilado a 250 ml con agua destilada y se reserva una alícuota para su posterior dosaje.

- Medición: se transfieren 5,0 ml del destilado a un matraz de 25 ml y se lleva a volumen final con fase móvil. Luego se procede en forma idéntica a la indicada para sistemas acuosos.

* Curva de calibración

Se empleó como método de cuantificación una curva de calibración externa basada en las relaciones área/masa de sorbato de potasio. La concentración de sorbato de potasio presente en las muestras se calculó interpolando el área obtenida, en la curva de calibración.

Para realizar la curva, se pipetea alícuotas de 1,0, 2,0, 3,0 y 4,0 ml respectivamente de la solución estándar y se transfieren a matraces de 25 ml. Los mismos se llevan a volumen con fase móvil. Si se los guarda herméticamente cerrados en heladera y al abrigo de la luz, pueden usarse durante una semana. Luego de preparados, los estándares se filtran y se inyectan en el equipo. Se obtiene una curva de calibración al graficar el área evaluada por el integrador versus la masa de sorbato contenida para cada uno de los estándares.

Una curva de calibración modelo es la siguiente:

Concentración de sorbato de potasio. 10^0 (g/ml)	Area
1,2	635.151
2,4	1.314.372
3,7	1.993.154
4,9	2.678.109

En todos los análisis realizados se obtuvieron coeficientes de correlación no menores a 0,999 para la curva de calibración.

3.3.2 - Sistemas utilizados

Las técnicas analíticas detalladas previamente fueron aplicadas tanto a sistemas modelo como a homogenatos cárnicos.

* Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A).

- Acido ortofosfórico (Merck).
- Glicina (Mallinckrodt).
- Nitrito de sodio (Mallinckrodt).

3.3.2.1 - Sistemas modelo acuosos

a) Evaluación de las técnicas en una solución acuosa de sorbato de potasio

Las técnicas I a IV y VI fueron aplicadas a una solución acuosa que contenía 2600 ppm de sorbato de potasio. Esta se preparó por pesada de sus componentes, luego se mezcló en un agitador magnético para asegurar la completa disolución del sorbato y se ajustó el pH a 5,0 por agregado de gotas de solución de ácido ortofosfórico (50 %, v/v).

Para la determinación de pH se empleó un electrodo de vidrio unido a un pHmetro Metrohm modelo E 632, previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. El error en la determinación de pH fue de 0,02 unidades de pH.

Una vez preparada la solución de sorbato se procedió a cuantificar el preservador mediante las distintas técnicas propuestas.

b) Evaluación de las técnicas (I) y (VI) en presencia nitrito de sodio en solución acuosa

La composición de los sistemas modelo analizados se detalla en la Tabla 3.1.

Los sistemas modelo se prepararon por pesada de los distintos componentes, luego se mezclaron con un agitador magnético para facilitar su disolución y se ajustó el pH a 6,0 mediante el agregado de gotas de ácido ortofosfórico (50 % v/v).

Para la determinación de pH se empleó un electrodo de vidrio unido a un pHmetro Metrohm modelo E 632, previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. El error en la determinación de pH fue de 0,02 unidades de pH.

Tabla 3.1: Composición de los sistemas modelo estudiados.

Sistema	Componente (% m/m)			Condiciones de almacenamiento
	H ₂ O	KS	NaNO ₂	
A	99,99	----	0,008	----
B	99,99	----	0,008	20 días a 57 C
C	99,73	0,26	0,008	----
D	99,73	0,26	0,008	20 días a 57 C
E	99,99	----	0,008	20 días a 57 C *

*luego del almacenamiento se adicionó 0,26 % (m/m) de sorbato de potasio (KS).

Con el objetivo de evaluar la confiabilidad de la técnica, alícuotas de 10 g de cada uno de los sistemas fueron colocadas en frascos de vidrio de 40 ml de capacidad. Los mismos se cerraron herméticamente para prevenir la evaporación, se envolvieron en papel aluminio para evitar la acción prooxidante de la luz y se almacenaron en una cámara de temperatura constante y convección forzada a 57°C ($\pm 0,5$ °C) si correspondía. Luego del almacenamiento, aquellos sistemas que no contenían sorbato de potasio en su composición fueron divididos en dos partes, a una de las cuales se le adicionó el preservador (0,26 %, m/m) previo a su análisis.

En todos los casos, las determinaciones se realizaron por duplicado.

c) Evaluación de las técnicas de (I) y (VI) en presencia de glicina

La composición y las condiciones de almacenamiento de los sistemas modelo analizados se detalla en la tabla 3.2.

Los distintos sistemas se prepararon en idéntica forma a la mencionada previamente. Se ajustó el pH a 5,0 mediante el agregado de gotas de ácido ortofosfórico (50 %, v/v).

Tabla 3.2: Composición de los sistemas modelo estudiados.

Sistema	Componente (% m/m)			Condiciones de almacenamiento
	H ₂ O	KS	Glicina	
F	99,24	----	0,76	----
G	99,24	----	0,76	20 días a 57 C
H	98,98	0,26	0,76	----
I	98,98	0,26	0,76	20 días a 57 C
J	99,04	----	0,76	20 días a 57 C*

*luego del almacenamiento se adicionó 0,26 % (m/m) de sorbato de potasio (KS).

3.3.2.2 - Homogenatos cárnicos

El sistema estudiado fue un homogenato cárnico (proporción carne/agua 90:10) que contenía 2600 ppm de sorbato de potasio. Para su preparación se utilizó carne vacuna (*Biceps femoris*), desgrasada en forma manual para remover la grasa superficial y picada mediante una picadora de uso doméstico. A la misma se adicionó agua y sorbato de potasio en la proporción indicada. Luego se homogeneizó el sistema en un homogeneizador Sorvall Omni Mixer (O.M.N.I corporation, U.S.A) para asegurar una distribución adecuada del preservador. Se ajustó el pH del sistema formado a 5,0, mediante el agregado de gotas de una solución de ácido ortofosfórico. El pH fue determinado mediante un electrodo pinchacarne Ingold (Ingold, Alemania) unido a un pHmetro Metrohm (Metrohm, Suiza).

Con el objetivo de evaluar la existencia de compuestos interferentes propios de la carne, o bien que se pudieran formar en el transcurso de la aplicación de alguna de las técnicas estudiadas, se preparó un homogenato control (sin la adición de sorbato).

Una vez preparados los homogenatos cárnicos se procedió a cuantificar el preservador mediante las técnicas I a VI.

Para determinar la sensibilidad de la técnica propuesta (V), se preparó un homogenato cárnico en la forma previamente indicada pero con un contenido de sorbato de potasio de 100 ppm (mínima concentración usada en alimentos (Sofos, 1980)).

Con el objetivo de evaluar la confiabilidad de la técnica propuesta (V), luego de un abuso térmico, alícuotas de 10 g del

sistema cárnico y del control fueron colocadas en sendos frascos de vidrio de 40 ml de capacidad. Los mismos se cerraron herméticamente para prevenir la evaporación, se envolvieron en papel aluminio para evitar la acción prooxidante de la luz y se almacenaron en una cámara de temperatura constante y convección forzada a 90 °C (+/- 0,5 °C) por 5 días. Luego del almacenamiento, el homogenato control fue dividido en dos partes, a una de las cuales se le adicionó el preservador (0,26 %, m/m) previo a su análisis.

3.3.3 - Análisis estadístico

A fin de evaluar objetivamente las diferentes técnicas aplicadas, se calculó el porcentaje de recuperación del sorbato de potasio y el coeficiente de variación. Además se realizó un test de hipótesis a fin de determinar si había diferencias significativas (a un nivel de probabilidad de 0,999) entre: a) la cantidad de preservador agregado (μ) y la cantidad determinada (x); b) la cantidad de sorbato determinada por dos técnicas diferentes (Sokal y Rohlf, 1980).

Todos los test utilizados se describen en el apéndice de "Procedimientos estadísticos".

3.3 - RESULTADOS Y DISCUSION

3.4.1 - Evaluación de los métodos I a IV y VI en soluciones acuosas de sorbato de potasio

Como se aprecia en la Tabla 3.3, todas las técnicas analizadas presentan buena precisión ya que en todos los casos los coeficientes de variación obtenidos son menores al 10 %.

Tabla 3.3: Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la determinación de sorbato de potasio en solución acuosa por aplicación de las técnicas I a IV y VI.

Método	μ (ppm)	\bar{x} (ppm)	Recuperación (%)	n	S (ppm)	c.v (%)	t_c
I	2600	2500	96	10	84,1	3,4	3,76
II	2600	2685	103	9	65,1	2,4	3,93
III	2600	1900	73	10	68,1	3,6	#32,50
IV	2600	2479	95	10	107,2	4,4	3,55
VI	2600	2569	99	10	36,6	1,4	2,68

μ : sorbato de potasio adicionado.

\bar{x} : sorbato de potasio dosado (promedio de las n determinaciones realizadas).

S: desviación estándar.

c.v: coeficiente de variación.

t_c : $(\bar{x} - \mu) / SE$

#: diferencia significativa entre μ y \bar{x} (P: 0,999).

En cuanto al porcentaje de recuperación del preservador, es alto para todas los métodos, con excepción del III, en el cual la recuperación es baja (73 %).

Un test de hipótesis no muestra diferencias significativas (a un nivel de probabilidad de 0,999) entre el valor verdadero (μ) es decir, la cantidad de sorbato de potasio adicionada y el valor promedio (\bar{x}), es decir la cantidad de sorbato de potasio dosada, cuando el dosaje se realiza mediante las técnicas I, II, IV o V. En cambio, se encuentran diferencias significativas (a un nivel de probabilidad de 0,999) en el caso de aplicar el método III.

En base a los resultados comentados se concluye que los métodos I, II, IV y VI resultan adecuados para el dosaje de sorbato en soluciones acuosas.

En este trabajo se analizará la estabilidad del sorbato en sistemas modelo acuosos de diversa composición. Tomando en consideración que el método I ha sido muy ampliamente usado y que se dispone de información acerca de su confiabilidad en presencia de distintos humectantes y aditivos (Gerschenson y col., 1986 y 1987; Guerrero y col., 1990), se considera a este método, el método de elección para sistemas acuosos, a menos que se verifiquen interferencias por parte de alguno de los componentes a adicionar, en cuyo caso se aplicará el método VI.

3.4.2 - Evaluación de los métodos I y VI en presencia de nitrito de sodio

Se evaluó la confiabilidad del método I en presencia de nitrito de sodio debido a que según bibliografía (Zipser y col., 1962), el nitrito de sodio interferiría en el dosaje del sorbato. En forma paralela, también se evaluó el método VI, como posibilidad alternativa, en el caso de no resultar confiable el dosaje del preservador mediante el método I.

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados obtenidos del dosaje de sorbato. Estos corresponden al promedio de 4 determinaciones.

Tabla 3.4: Evaluación del sorbato de potasio por los métodos I y VI en presencia de nitrito de sodio.

Sistema	Sorbato de potasio (ppm)	
	Método I	Método VI
A	0	0
B	0	0
C	2542	2569
D	3219	2540
E	2613	2560

En base a los resultados detallados en la Tabla 3.4 se puede concluir que:

* La presencia de nitrito de sodio no da falsos positivos en la determinación del sorbato de potasio, independientemente de haber sufrido o no un proceso de almacenamiento (sistemas A y B).

* Las sustancias que pudieran originarse a partir del nitrito de sodio durante su almacenamiento a alta temperatura no interfieren en el dosaje. Esto se observa en la experiencia en la cual el sorbato de potasio es agregado luego del almacenamiento (sistema E).

* Para muestras no almacenadas, la presencia conjunta de nitrito de sodio y sorbato de potasio (sistema C) no interfiere en el dosaje de este último. La cantidad de sorbato de potasio dosada (método I, 2542 ppm; método VI, 2569 ppm) no presenta diferencias significativas con la cantidad adicionada (2600 ppm) a un nivel de probabilidad de 0,999.

* La presencia conjunta de nitrito de sodio y sorbato de potasio durante el almacenamiento daría lugar a productos que interferirían en el dosaje de este último, cuando se aplica el método I. Después del almacenamiento el contenido de sorbato de potasio dosado es 3219 ppm. Esta cantidad es significativamente mayor a la adicionada (2600 ppm). En cambio, cuando el dosaje se realiza por el método VI, no se producirían interferencias en la cuantificación ya que, en este caso, el contenido de sorbato de potasio dosado es 2560 ppm.

En base a los resultados obtenidos, el método I no resultaría adecuado para el dosaje de sorbato de potasio en presencia de nitrito de sodio debido a que durante el almacenamiento se formarían compuestos interferentes. En este caso, se aconseja aplicar el método VI.

3.4.3 - Evaluación de los métodos I y VI en presencia de glicina

La glicina junto con los compuestos carbonílicos formados por la oxidación del ácido sórbico, participa en reacciones de pardeamiento no enzimático (Seow y Cheah, 1986, b; Thakur y Arya, 1991). Como resultado de éstas se forman aldehídos que pueden producir compuestos coloreados con el ácido sórbico vía reacción de Komarowsky (Salo, 1966). En el caso de ocurrir, estas reacciones podrían interferir en el dosaje de sorbato por el método I. En base a estas consideraciones, se evaluó la confiabilidad del método I en presencia de glicina. Además, se evaluó el método VI.

En la Tabla 3.5, se detallan los resultados obtenidos, estos corresponden al promedio de cuatro determinaciones.

Tabla 3.5: Evaluación del sorbato de potasio en presencia de glicina por los métodos I a VI.

Sistema	Sorbato de potasio (ppm)	
	Método I	Método VI
F	0	0
G	0	0
H	2581	2613
I	1700	1664
J	2572	2560

En base a los resultados detallados en la Tabla 3.5 se puede concluir que :

* La glicina por sí misma no interfiere en la determinación del sorbato dando falsos positivos, independientemente de haber sufrido o no un proceso de almacenamiento (sistemas F y G).

* Las sustancias que pudieran originarse a partir de la glicina durante su almacenamiento no interfieren en el dosaje del sorbato de potasio por ninguno de los dos métodos empleados. Esto se observa en la experiencia en la cual el sorbato de potasio es agregado luego del almacenamiento (sistema J).

* Para muestras no almacenadas, la presencia de glicina junto con el sorbato de potasio (Sistema H) no afecta el dosaje de este último. Como se observa en la Tabla 3.5, el contenido de sorbato de potasio dosado por ambos métodos no presenta diferencias significativas con el adicionado (nivel de probabilidad 0,999).

* La presencia conjunta de glicina y sorbato de potasio durante el almacenamiento no interfiere dando valores en exceso en la cuantificación de este último por el método I o VI. Después del almacenamiento el contenido de sorbato de potasio decae a 1664-1700 ppm. Además, se observa que los resultados obtenidos por ambos métodos son muy similares lo que indicaría una muy buena correspondencia entre dichas técnicas.

En base a los resultados obtenidos, cualquiera de los métodos evaluados resulta adecuado para el dosaje de sorbato de potasio en presencia de glicina.

3.4.4 - Evaluación de los métodos I a VI en homogenatos cárnicos

Como puede observarse en la Tabla 3.6, los métodos I a IV no permiten una adecuada recuperación del preservador a partir de homogenatos cárnicos.

Tabla 3.6: Análisis estadístico de los resultados obtenido en la determinación de sorbato de potasio en homogenatos cárnicos por aplicación de las técnicas I a VI.

Método	μ (ppm)	\bar{x} (ppm)	Recuperación (%)	n	S (ppm)	c.v (%)	t _c
I	2600	1459	56	10	229,5	15,7	#14,91
II	2600	2179	84	9	202,5	9,3	#6,24
III	2600	1715	66	10	72,7	4,2	#38,42
IV	2600	1351	52	10	259,2	19,2	#15,24
V	2600	2651	102	15	181,9	6,9	1,09
V	100	99	99	10	2,1	2,1	1,50
VI	2600	2620	101	10	45,5	1,7	1,39

μ : sorbato de potasio adicionado.

\bar{x} : sorbato de potasio dosado (promedio de las n determinaciones realizadas).

S: desviación estándar.

c.v: coeficiente de variación.

t_c: $(\bar{x} - \mu) / SE$

#: diferencia significativa entre μ y \bar{x} (P: 0,999).

En dichos casos, la concentración de sorbato dosada es significativamente menor a la adicionada. Además, la precisión de dichos métodos, evaluada mediante el coeficiente de variación, es baja, pues el coeficiente de variación es mayor al 10 %, con excepción del método III. Estos resultados sugieren que los procedimientos usados para extraer el sorbato contenido en los homogenatos cárnicos, no han sido eficientes, ya que los métodos considerados han sido adecuados en los sistemas acuosos ensayados en

este trabajo y en otros sistemas alimenticios (A.O.A.C, 1980; Melnick y Luckmann, 1954; Ciaccio, 1966).

La técnica propuesta (método V), proporciona una alta recuperación del sorbato (102 %) y su precisión es adecuada. Probablemente, el tratamiento de desintegración y dispersión con arena, al incrementar la superficie de contacto con los reactivos durante el proceso de destilación por arrastre con vapor, mejore la eficiencia de la extracción.

Cuando la técnica se aplicó a homogenatos cárnicos con 100 ppm de sorbato de potasio, se obtuvieron resultados análogos.

En el caso del método VI, la extracción del sorbato se realiza en forma idéntica a la mencionada para el método V y los resultados obtenidos por ambos métodos no presentan diferencias significativas para un nivel de confianza del 99,9 %. El porcentaje de recuperación del preservador y la precisión en la cuantificación son similares en ambos casos.

Cabe destacar que la germinación de esporas de *Clostridium botulinum* es inhibida por la adición de 2600 ppm de sorbato de potasio (Sofos y Busta, 1981) y la mínima concentración inhibitoria (M.I.C) de sorbato de potasio es 134 ppm, en el caso de carne fresca (Zamora y Zaritzky, 1987, a).

Para confirmar la ausencia de interferencias al dosaje producidas por la oxidación de lípidos durante la destilación por arrastre con vapor y descartar la formación de las mismas durante el almacenamiento del producto (Handschack, 1963), se preparó un homogenato similar a los analizados con y sin la adición de sorbato de potasio. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Influencia del almacenamiento y de los componentes de la carne sobre el dosaje de sorbato de potasio mediante el método propuesto (V).

Sistema	Condiciones de almacenamiento	x (ppm)	n	S (ppm)	c.v (%)
carne/agua		0	5		
carne/agua	5 días a 90 °C	0	5		
carne/agua	5 días a 90 °C *	2598	5	30,22	1,17
carne/agua/KS (2600 ppm)	5 días a 90 °C	1126	10	64,37	5,71

* luego del almacenamiento se adicionó 0,26 % de sorbato de potasio.

En base a los resultados detallados en la Tabla 3.7 se puede concluir que:

* La carne por sí misma no interfiere en la determinación del sorbato dando falsos positivos, independientemente de haber sufrido o no un almacenamiento a alta temperatura.

* Las sustancias que pudieran originarse a partir de la carne durante su almacenamiento a alta temperatura no interfieren en el dosaje. Esto se observa en la experiencia en la cual el sorbato de potasio es agregado luego del almacenamiento del homogenato cárnico a 90°C.

* La presencia conjunta de carne y sorbato de potasio durante el almacenamiento no interferiría en la cuantificación de este último. Después del almacenamiento, el contenido de sorbato de potasio decae a 867 ppm. Además, se observa que al igual que en el caso de un sistema que no fue sometido a almacenamiento, la precisión de la técnica aplicada es buena.

En base a los resultados obtenidos, el método propuesto resulta adecuado para el dosaje de sorbato de potasio en carnes.

3.5 - CONCLUSIONES

A partir de la evaluación de distintos métodos analíticos empleados para la cuantificación de sorbatos en sistemas modelo acuosos y en homogenatos cárnicos, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

* Los métodos I (A.O.A.C, 1980), II (A.O.A.C, 1980), IV (Ciaccio, 1966) y VI (puesto a punto en este trabajo) resultaron adecuados para la cuantificación de sorbatos en solución acuosa.

* En presencia de nitrito de sodio, el método I (A.O.A.C, 1980) no resulta adecuado para el dosaje de sorbato ya que durante el almacenamiento de sistemas modelo acuosos se forman compuestos interferentes que conducen a resultados por exceso en las determinaciones. En este caso, el método VI es adecuado para cuantificar el preservador.

* La presencia de glicina no interfiere en el dosaje de sorbatos mediante el método I (A.O.A.C, 1980). El dosaje de sorbatos mediante el método I o VI resulta equivalente.

* En cuanto al dosaje de sorbatos en homogenatos cárnicos, los métodos I (A.O.A.C, 1980), II (A.O.A.C, 1980), III (Melnick y Luckmann, 1954), IV (Ciaccio, 1966) no son idóneos ya que no permiten una adecuada recuperación del preservador. Probablemente esto se deba a una ineficiente extracción del sorbato contenido en los homogenatos cárnicos.

* Para poder aplicar el método I (A.O.A.C, 1980) al dosaje de sorbatos en homogenatos cárnicos es necesaria una modificación en el proceso de extracción. La modificación aquí propuesta (método V) consiste en realizar una disgregación de la muestra con arena, previamente a la destilación por arrastre con vapor. Este pretratamiento permite incrementar la superficie de contacto con los reactivos durante la etapa de extracción, permitiendo una alta recuperación del sorbato (102 %). Además, la precisión obtenida es adecuada.

* En sistemas cárnicos que contengan nitrito de sodio se propone realizar la cuantificación de sorbatos por el método VI, ya que el método I presenta interferencias. En este caso, la extracción del preservador debe realizarse por destilación por arrastre con vapor previa disgregación de la muestra con arena.

* La carne o bien los compuestos que pudieran originarse durante el almacenamiento no interfieren en el dosaje del preservador por los métodos V o VI. El dosaje de sorbatos en homogenatos cárnicos por los métodos citados resulta equivalente.

4 - ESTABILIDAD DEL ACIDO SORBICO EN SISTEMAS MODELO ACUOSOS

4.1 - INTRODUCCION, p. 92

- 4.1.1 Cinética de degradación oxidativa, p. 92
- 4.1.2 Factores que afectan la degradación oxidativa de los sorbatos, p. 95
- 4.1.3 Influencia de la degradación del ácido sórbico sobre el pardeamiento no enzimático, p. 103
 - 4.1.3.1 Reacciones de pardeamiento no enzimático, p. 103
 - 4.1.3.1.1 Esquema general y etapas de las reacciones de pardeamiento no enzimático, p. 105
 - 4.1.3.1.2 Evaluación del pardeamiento no enzimático, p. 108
 - 4.1.3.1.3 Reacciones de pardeamiento inducidas por los sorbatos y/o por sus productos de degradación, p. 109
 - 4.1.3.1.4 Factores que afectan a las reacciones de pardeamiento no enzimático, con especial referencia al pardeamiento asociado con la destrucción de los sorbatos, p. 111

4.2 - OBJETIVOS, p. 120

4.3 - MATERIALES Y METODOS, p. 121

- 4.3.1 Sistemas modelo, p. 121
 - 4.3.1.1 Cálculo de la actividad de agua, p. 122
 - 4.3.1.2 Composición de los sistemas modelo, 123
 - 4.3.1.3 Preparación de los sistemas modelo, p. 127
 - 4.3.1.4 Medición de la actividad de agua de los sistemas formulados, p. 127
- 4.3.2 Condiciones de almacenamiento, p. 128
- 4.3.3 Determinación de los sorbatos, p. 128
- 4.3.4 Determinación de hierro, p. 128
- 4.3.5 Determinación del pardeamiento no enzimático, p. 129
- 4.3.6 Determinación del grado de hidrólisis de la sacarosa, p.129
- 4.3.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos, p. 131

4.4 - RESULTADOS Y DISCUSION, p. 132

- 4.4.1 Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción de los sorbatos, p. 132
- 4.4.2 Parámetros cinéticos de las reacciones de pardeamiento no enzimático inducidas por los sorbatos y/o por sus productos de degradación, p. 135
- 4.4.3 Influencia de la temperatura sobre la estabilidad, p. 135
- 4.4.4 Influencia del pH, p. 146
 - 4.4.4.1 Degradación de los sorbatos, p. 146
 - 4.4.4.2 Pardeamiento no enzimático, p. 148
- 4.4.5 Influencia del ácido usado para ajustar el pH, p. 152
 - 4.4.5.1 Degradación de los sorbatos, p. 152
 - 4.4.5.2 Pardeamiento no enzimático, p. 158
- 4.4.6 Influencia de la depresión de la actividad de agua a 0,91 y del humectante usado para ello, p. 160
 - 4.4.6.1 Degradación de los sorbatos, p. 160
 - 4.4.6.2 Pardeamiento no enzimático, p. 167
- 4.4.7 Influencia de la presencia de glicina, p. 171
 - 4.4.7.1 Degradación de los sorbatos, p. 171
 - 4.4.7.2 Pardeamiento no enzimático, p. 179

4.4.8	Influencia del material de empaque, p. 187
4.4.8.1	Degradación de los sorbatos, p. 187
4.4.8.2	Pardeamiento no enzimático, p. 190
4.4.9	Influencia de distintos aditivos, p. 190
4.4.9.1	Influencia de la sal disódica del ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), p. 192
4.4.9.1.1	Degradación de los sorbatos, p. 192
4.4.9.1.2	Pardeamiento no enzimático, p. 198
4.4.9.2	Influencia del propilgalato sobre la estabilidad, p. 200
4.4.9.3	Influencia de los polifosfatos, p. 202
4.4.9.3.1	Degradación de los sorbatos, p. 202
4.4.9.3.2	Pardeamiento no enzimático, p. 205
4.4.9.4	Influencia del ácido ascórbico, p. 205
4.4.9.4.1	Degradación de los sorbatos, p. 205
4.4.9.4.2	Pardeamiento no enzimático, p. 211
4.4.9.5	Influencia del nitrito de sodio sobre la estabilidad, p. 213
4.4.9.6	Influencia de la sacarosa, p. 220
4.4.9.6.1	Degradación de los sorbatos, p. 221
4.4.9.6.2	Pardeamiento no enzimático, p. 221
4.4.9.7	Influencia global de los componentes de la sal de cura sobre la estabilidad, p. 228
4.4.10	Influencia de la degradación de los sorbatos sobre el desarrollo de pardeamiento no enzimático, p. 231

4.5 - CONCLUSIONES, p. 238

4.1 - INTRODUCCION

En la actualidad, la preservación de los alimentos se realiza mediante la aplicación de tratamientos tradicionales como congelación, deshidratación, esterilización o bien por métodos combinados. Estos involucran el uso de tratamientos térmicos suaves, control de pH, actividad de agua y agregado de preservadores permitidos. Entre estos últimos se encuentra el ácido sórbico y sus sales, llamados colectivamente sorbatos. Ellos inhiben el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias.

Los sorbatos son estables en forma seca pero presentan inestabilidad en solución acuosa (Arya, 1980; Gerschenson, 1986). Como se mencionó previamente (sección 1.2.3.1), este preservador se degrada en presencia de oxígeno formándose compuestos carbonílicos, los cuales pueden participar en reacciones de pardeamiento afectando las características organolépticas del producto. Además la disminución del tenor del preservador, debida a su oxidación, puede llevar a concentraciones no efectivas, que atenten contra la estabilidad microbiológica del alimento.

4.1.1 - Cinética de degradación oxidativa

La cinética de degradación del ácido sórbico ha sido motivo de estudio de diversos autores, que analizaron el efecto de distintas variables sobre la velocidad de la reacción. En la Tabla 4.1, se resumen los factores estudiados en los diferentes trabajos. Podemos ver allí que la degradación de los sorbatos depende de numerosos factores: luz, oxígeno, pH, temperatura, presencia de sales, azúcares, ácidos, trazas de iones metálicos, otros componentes del alimento, material de empaque, etc.

A los valores de pH propios de los alimentos (5,0 - 6,0), el ácido sórbico se encuentra parcialmente ionizado ya que su constante de disociación es $4,68 \cdot 10^{-6}$ en solución acuosa a 25°C. Por esta razón, los estudios de estabilidad del mismo se refieren a la degradación de ambas formas (sorbatos).

En general, la degradación de los sorbatos puede ser aproximada a una cinética de primer orden (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1983; Seow y Cheah, 1985, a; Gerschenson y col., 1986; Guerrero y col., 1990).

Tabla 4.1: Factores reportados en bibliografía que afectan la estabilidad de los sorbatos en sistemas modelo y en alimentos.

Sustrato	Factores	Autor
soluciones acuosas	propilgalato	Marx y Sabalitschka (1965)
soluciones acuosas de ácido cítrico y jugo de naranja	concentración de ácido cítrico, metales, ácido ascórbico, NaCl	Pekkarinen (1969)
soluciones acuosas	antioxidantes, alcoholes	McCarthy y col. (1973)
soluciones acuosas	propilgalato	Pekkarinen (1975)
soluciones acuosas	temperatura, pH, sacarosa, metales, sales aminoácidos, glicerol	Arya (1980)
ciruelas	temperatura, humedad, atmósfera de N ₂	Bolin y col. (1980)
soluciones acuosas	luz, SO ₂ , pH	Saxby y col. (1982)
soluciones acuosas, homogenatos de naranja	material de empaque, acidificantes, SO ₂ , sacarosa	Vidyasagar y Arya (1983)
homogenatos de fruta, pasta de pescado	material de empaque, pH, SO ₂	Vidyasagar y Arya (1984)
soluciones acuosas	a _w , temperatura, pardeamiento, Co ²⁺	Seow y Cheah (1985, a)
duraznos preservados por métodos combinados	temperatura, glucosa, SO ₂	Gerschenson y col. (1986)
soluciones acuosas de a _w 0.94	temperatura, pH, humectante usado (glucosa, sacarosa) SO ₂ , lisina	Gerschenson y col. (1986)

Continuación Tabla 4.1

soluciones acuosas de a_w 0.91	temperatura, pH, humectante usado (NaCl, glicerol)	Gerschenson y col. (1987)
soluciones acuosas	glicina, Cu^{2+}	Arya y Thakur (1988)
soluciones acuosas	temperatura, pH, concentración de NaCl	Guerrero y col. (1990)

$$-dc/dt = k.c$$

donde: c = concentración de ácido sórbico (g/l)
t = tiempo (día)
k = constante de velocidad de orden 1 (día⁻¹)

Sin embargo, Bolin y col. (1980) encontraron que en el caso de ciruelas de alta humedad, la reacción de degradación de los sorbatos no se ajustaba a una cinética de primer orden.

En general, la dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura se ajusta al modelo de Arrhenius (Seow y Cheah, 1985, a; Gerschenson y col., 1986 y 1987; Guerrero y col., 1990). Arya (1980) no encontró esta dependencia y postuló que esto se debía al hecho de ser la degradación del sorbato una reacción por radicales libres.

El valor de la energía de activación presenta grandes variaciones en función de la composición del sistema. Por ejemplo, Seow y Cheah (1985, a) reportaron un valor de 5,8 kcal/mol para un sistema agua/glicerol/sorbato/Co²⁺ con a_w 0,80 y pH 4,0, mientras que Gerschenson y col. (1986) reportaron un valor de 32 kcal/mol para un sistema formado por agua/ glucosa/ sorbato/ lisina y con a_w 0,94 y pH 4,5.

4.1.2 - Factores que afectan la degradación oxidativa de los sorbatos

A continuación se analizarán los principales factores que afectan la degradación de los sorbatos según consta en bibliografía.

a) Temperatura

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de pérdida de los sorbatos ha sido estudiado, desde el punto de vista cinético por diversos autores. Gerschenson y col. (1986) estudiaron la cinética de degradación del ácido sórbico en duraznos preservados por métodos combinados y encontraron que la vida media del preservador (tiempo necesario para que ocurra el 50 % de destrucción) era de aproximadamente 284 días a 20 °C y se reducía a 52 días cuando la temperatura de almacenamiento se incrementaba a 45 °C. En todos los trabajos realizados se encontró un efecto acelerador de la temperatura en la velocidad de degradación del ácido sórbico. La magnitud de este efecto, está relacionada con el valor de la energía de activación que, como se mencionó previamente, está influenciada por la composición del sistema.

b) Luz

Pekkarinen (1969) encontró que una solución al 0,15 % de ácido sórbico almacenada durante un año expuesta a la luz, se descompone en un 90 por ciento, mientras que al abrigo de la luz, se descompone en un 60 por ciento.

Saxby y col. (1982) estudiaron la degradación del ácido sórbico en soluciones acuosas cuyo pH se ajustó a 5,4 (mediante el agregado de un buffer de $\text{PO}_4\text{H}_2^-/\text{PO}_4\text{H}^{2-}$), a 4,5 (mediante el agregado de un buffer HAcO/NaOH), a 2,6 y a 1,2 (mediante el agregado de una solución de H_2SO_4). Ellos almacenaron una parte de las soluciones en frascos de vidrio transparente y la otra en frascos de vidrio oscuro envuelto en papel de aluminio. En ambos casos se realizó el almacenamiento bajo luz fluorescente. Ellos observaron que, a muy bajo pH, independientemente de la acción de la luz, el grado de degradación era importante. Sin embargo, a pH 2,6 la presencia de luz tenía un efecto acelerante.

En presencia de un exceso de dióxido de azufre (1,7 partes por 1 parte de ácido sórbico), a pH 2,1, en ocho días de almacenamiento en presencia de luz, se llega a una destrucción total del ácido sórbico.

La energía lumínica aceleraría, así, la degradación del ácido sórbico pero la magnitud de este efecto dependería del pH o/y de la composición del sistema.

c) Oxígeno

Para que los sorbatos se oxiden, el oxígeno debe difundir de la cámara de aire al seno del alimento (líquido o sólido). Por lo tanto, se tiene asociado a la reacción química, un fenómeno de difusión. Este hecho tiene especial relevancia en el caso de sistemas sólidos en los cuales la difusión de oxígeno puede ser un paso limitante en el desarrollo de la reacción de oxidación.

McCarthy y Eagles (1976) encontraron que no se producían pérdidas en el contenido de ácido sórbico en soluciones almacenadas durante nueve semanas cuando éstas se envasaban en atmósfera de nitrógeno, mientras que en el sistema control se producía un 30 % de pérdidas. Bolin y col. (1980), en cambio, reportaron que las pérdidas de ácido sórbico en ciruelas almacenadas bajo atmósfera de nitrógeno por nueve meses a 21 y a 32 °C, no fueron significativamente diferentes de las obtenidas cuando el almacenamiento se realizaba con cámara de aire.

d) Material de empaque

Vidyasagar y Arya (1983 y 1984) estudiaron el efecto de diferentes materiales de empaque (vidrio, polipropileno, películas laminadas) en la degradación de los sorbatos en soluciones acuosas y en alimentos (pasta de pescado y homogenatos de frutas) almacenados a 37 °C. Ellos observaron que las pérdidas de ácido sórbico eran función del material de empaque. En todos los sistemas estudiados, la caída del preservador era alta cuando se usaba polipropileno; en cambio se registraban escasas pérdidas en vidrio y películas laminadas impermeables al oxígeno.

e) pH

Arya (1980) observó una mayor degradación a menor pH, postulando que solamente la fracción no disociada es susceptible de oxidarse. Vidyasagar y Arya (1984) encontraron que la retención de ácido sórbico en pasta de pescado almacenada a 37 °C se incrementaba cuando se elevaba el pH del alimento de 3,5 a 4,2. Diversos autores han reportado la misma tendencia (Gerschenson y col., 1986 y 1987; Guerrero y col., 1990).

En base a lo mencionado, se concluye que la estabilidad de los sorbatos se incrementa con el aumento de pH. Sin embargo, se debe tener presente que un aumento de pH en un alimento disminuye la capacidad antimicrobiana del preservador.

f) Acidificante usado

Además del efecto de pH *per se*, se observó que el ácido usado para regular el mismo tiene influencia sobre la degradación del sorbato. Pekkarinen (1969) encontró que el ion sulfato aceleraba la degradación mientras que el ion cloruro ejercía un efecto retardante. Vidyasagar y Arya (1983) estudiaron el efecto de distintos ácidos orgánicos (málico, oxálico, tartárico, fumárico, láctico y cítrico) sobre la velocidad de degradación de soluciones acuosas de ácido sórbico a 37 °C, concluyendo que el ácido cítrico y el málico ejercen un efecto protector.

g) Actividad de agua

En la literatura se reportan diferentes tendencias sobre el efecto de la depresión de la actividad de agua en la degradación de los sorbatos.

Seow y Cheah (1985, b) estudiaron la degradación del ácido sórbico en soluciones acuosas de glicerol que contenían 0,3 % de sorbato de potasio a pH 4,0 en el rango de actividades de agua de 0,71 - 1,0. Ellos observaron que al aumentar la actividad de agua, disminuía la constante de velocidad.

Thakur y Arya (1991) estudiaron la destrucción del ácido sórbico en sistemas sólidos formados por celulosa microcristalina equilibrada a diferentes actividades de agua y observaron que la velocidad de degradación del ácido sórbico se incrementaba con el aumento de actividad de agua en el rango de 0,57 - 1,00.

Guerrero y col.(1990) y Gerschenson y col.(1986) estudiaron la estabilidad de soluciones acuosas de sorbato de potasio al 0,20 % (m/m) a las que se deprimió la actividad de agua en el rango de 0,91 - 0,98 mediante el agregado de NaCl. Estos autores encontraron que para interpretar los resultados obtenidos se debían considerar algunas interacciones específicas NaCl-agua y que no era posible analizar separadamente los efectos de la depresión de la actividad de agua y del humectante adicionado con ese objetivo.

h) Sales

Arya (1980) estudió la influencia de distintas sales sobre la degradación a 37 °C del ácido sórbico en solución acuosa. Él observó que el NaCl y el KCl ejercían un efecto protector, el cual se incrementaba al aumentar la concentración de estas sales en el rango de 0,1 - 2,0 %. Además encontró que el LiCl y los sulfatos de Na⁺, K⁺ y NH₄⁺ y el Na₂HPO₄ y el Na₃PO₄ al 2,0 %, ejercían un efecto prooxidante. Cabe destacar que el efecto de los fosfatos es contradictorio con informaciones previas, ya que en general éstos se adicionan para proteger la oxidación de grasas y aceites por su capacidad para complejar trazas de metales.

Guerrero y col. (1990) encontraron un efecto específico del NaCl en la destrucción de los sorbatos por su acción prooxidante y su influencia en los mecanismos por radicales libres involucrados.

i) Aminoácidos

Como se mencionó previamente, en la degradación oxidativa del ácido sórbico se forman compuestos carbonílicos, los que pueden polimerizarse formando productos pardos, y/o reaccionar con aminoácidos por el mecanismo de Maillard formándose pigmentos marrones, los que afectan las características organolépticas de los alimentos.

Arya (1980) estudió el efecto de diferentes aminoácidos sobre la degradación del ácido sórbico en soluciones acuosas almacenadas a 37 °C. El encontró que glicina, alanina, fenilalanina, serina y asparagina incrementaban la velocidad de degradación del preservador.

La adición de histidina y arginina a una solución acuosa al 0,2 % de ácido sórbico aumenta su pH de 3,3 a 4,9 . Por lo tanto, los aminoácidos mencionados tienen un efecto estabilizante por el aumento de pH que producen y, además, por el hecho de que en solución acuosa, el grupo carboxilo del ácido sórbico forma una unión salina con el átomo de nitrógeno básico de la molécula del aminoácido. De esta forma, se incrementa el grado de ionización del ácido sórbico y, por ende, su estabilidad. Si se ajusta el pH de las soluciones de histidina y arginina a 3,3 mediante el agregado de HCl, se elimina el efecto estabilizante antes mencionado. A bajo pH, el átomo de nitrógeno del aminoácido se encuentra protonado y, por lo tanto, no está disponible para unirse con el ácido sórbico.

Thakur y Arya (1991) estudiaron la degradación del sorbato en soluciones acuosas que contenían glucosa y glicerol y observaron que la adición de glicina o de lisina disminuía la velocidad de degradación del ácido sórbico. La misma tendencia fue informada por Gerschenson y col.(1986) con respecto a la adición de lisina a soluciones de glucosa a pH 4,5 almacenadas a 20 y 30 °C. Estos autores, atribuyeron sus resultados a la acción inhibitoria de los productos de Maillard formados.

j) Azúcares

Arya (1980) encontró que la adición de sacarosa, a sistemas acuosos, en concentraciones menores al 5 % (m/v) no tenía un efecto apreciable sobre la velocidad de degradación del ácido sórbico. En concentraciones mayores, ejercía un efecto protector.

Gerschenson y col. (1986) observaron que la presencia de sacarosa (52,0 %, m/m) o glucosa (36,0 %, m/m) en una solución acuosa que contenía 0,10 % (m/m) de sorbato de potasio a pH 3,5, incrementaba la velocidad de destrucción del preservador. Cabe destacar que la adición de azúcar mencionada produce un cambio en la actividad de agua del sistema.

En base a lo comentado, el efecto de los azúcares sobre la degradación del sorbato sería función de su concentración.

k) Sulfito

El dióxido de azufre solo o en combinación con benzoato o sorbato es muy usado en la preservación de frutas y jugos. Su efecto sobre la degradación de los sorbatos es complejo.

Saxby y col. (1982) estudiaron la degradación del ácido sórbico en presencia de SO_2 . Ellos observaron que cuando la concentración de ácido sórbico sobrepasaba ligeramente la de SO_2 (1,7 : 1,0), la velocidad de degradación de una solución acuosa al 0,15 % (m/v) a pH 2,1 y en presencia de luz era alta; en ocho días se llegaba a la destrucción total del preservador. Sin embargo, cuando se empleaba un gran exceso de ácido sórbico en relación al SO_2 (4,0 : 1,0), la velocidad de degradación era menor, obteniéndose un decaimiento del preservador de un 85 % en 30 días. En ausencia de SO_2 , la degradación era de un 70 % en el mismo lapso de tiempo. Como se mencionó previamente (sección 1.2.2.2) el ácido sórbico reaccionaría con el dióxido de azufre mediante reacciones de adición (Hägglund y Rigbom, 1926).

Si se considera que en vinos el nivel máximo permitido de ácido sórbico es de 200 mg/l y el de dióxido de azufre es 450 mg/l, probablemente el ácido sórbico se degrade totalmente en una o dos semanas.

Vidyasagar y Arya (1983) estudiaron el efecto de la adición de dióxido de azufre sobre la degradación del sorbato en soluciones acuosas y en homogenatos de naranja. Ellos encontraron que en soluciones acuosas, la adición de sulfito en el rango de 250-1000 ppm aceleraba significativamente la degradación del sorbato. Sin embargo, en homogenato de naranja (45 Brix y 1,2 % de acidez titulable), la adición de 350 ppm de metabisulfito no influyó significativamente la velocidad de degradación del ácido sórbico. Estos autores han sugerido que una gran proporción del SO_2 adicionado al homogenato de naranja se perdería en las primeras etapas del almacenamiento debido a su oxidación, o bien por reacción con otros constituyentes del alimento formando compuestos de adición con aldehídos, cetonas y azúcares reductores. En consecuencia, no se encontraría disponible para participar en reacciones con radicales libres y catalizar la oxidación del ácido sórbico.

Gerschenson y col. (1986) encontraron que la adición de 150 ppm de NaHSO_3 a una solución acuosa que contenía 1000 ppm de sorbato de potasio (pH 3,5 y a_w 0,94 ajustada por el agregado de glucosa) no influenciaba la velocidad de degradación del preservador durante el almacenamiento a temperaturas de 20 a 45 °C.

1) Metales

El efecto de los metales sobre la degradación del ácido sórbico es complejo. A continuación se comentan los principales estudios realizados sobre este tema.

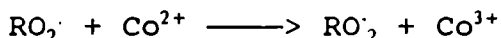
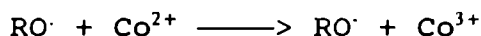
Arya (1980) estudió el efecto de trazas de iones metálicos sobre la degradación del ácido sórbico. El encontró que el Cu^{2+} , Fe^{2+} y el Mn^{2+} poseían un efecto estabilizante mientras que el Ni^{2+} tenía un ligero efecto catalítico y Zn^{2+} no presentaba un efecto significativo sobre la velocidad de degradación.

Arya y Thakur (1988) estudiaron el efecto de la adición de 100 ppm de CuSO_4 sobre la degradación del ácido sórbico en soluciones acuosas que contenían glicina y 0,2 % (m/v) de ácido sórbico. Ellos observaron que luego de 23 días de almacenamiento no había pérdidas en el contenido de ácido sórbico mientras que en ausencia de Cu^{2+} se había destruido el 50 % del preservador.

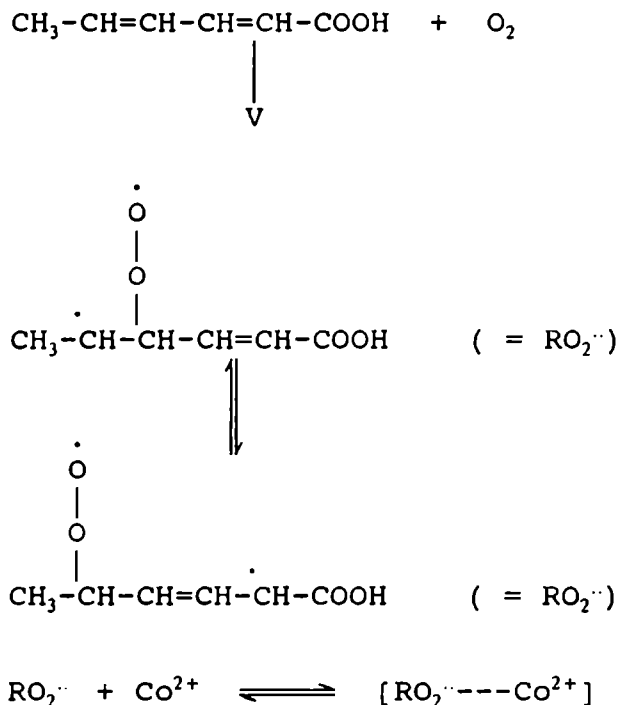
Pekkarinen (1969, b) también informó acerca del efecto protector del Cu^{2+} sobre la degradación del ácido sórbico en soluciones de ácido cítrico. Con respecto al efecto del Fe^{3+} , observó que soluciones muy diluidas (del orden de 10^{-5} M) aceleraban la degradación mientras que mayores concentraciones tenían un efecto protector.

Seow y Cheah (1985, a) estudiaron la degradación a pH 4,0 del ácido sórbico en soluciones acuosas al 0,3 % (m/v) de sorbato de potasio y glicerol en cantidad suficiente para ajustar la actividad acuosa en el rango comprendido entre 0,71 - 1,00. Estos autores encontraron que la adición de Co^{2+} (≈ 100 ppm) tenía un efecto estabilizante. Por ejemplo, la constante de velocidad a 60°C y a_w 0,80 era $4,67 \cdot 10^{-2}/\text{día}$ y en presencia de Co^{2+} era $2,65 \cdot 10^{-2}/\text{día}$. Además, la sensibilidad de la reacción frente a la temperatura disminuía por la adición de Co^{2+} , dado que la energía de activación era 7,8 kcal/mol y en presencia de Co^{2+} era 5,8 kcal/mol.

Los iones de metales pesados, en general, aceleran la oxidación de compuestos orgánicos (Ingold, 1961), sin embargo, bajo ciertas condiciones pueden actuar como inhibidores. Por ejemplo, Betts y Uri (1966) encontraron que ciertos compuestos de cobalto actúan como catalizadores en bajas concentraciones y como inhibidores, cuando su concentración es alta. Diferentes investigadores han sugerido que la inhibición es el resultado de la formación de un complejo entre un ion metálico y un radical libre. Este complejo es relativamente inactivo y las reacciones de finalización, mediante las cuales se consumen los radicales libres, son:



Probablemente, mecanismos semejantes al mencionado sean los que disminuyen la velocidad de degradación en presencia de Co^{2+} y de otros iones metálicos. La inhibición probablemente proceda como el resultado de la formación de complejos lábiles entre iones metálicos y biradicales peróxido los cuales se producen durante la autooxidación de compuestos con dobles enlaces conjugados (Pekkarinen, 1972). El esquema de la reacción podría ser el siguiente:



El grado de estabilización dado por diferentes iones metálicos estaría determinado por su capacidad para formar complejos y por la estabilidad de estos.

m) Propilgalato

La adición de propilgalato tiene un efecto protector sobre la degradación del ácido sórbico (Marx y Sabalitschka, 1966; Pekkarinen, 1975; Arya, 1980). Probablemente ello se deba a su efecto como antioxidante, ya que McCarthy y col. (1973) han sugerido que el uso de antioxidantes en el material de empaque disminuye las pérdidas de ácido sórbico durante el almacenamiento.

n) Alcoholes

Los alcoholes inhiben la degradación del ácido sórbico en soluciones de ácido sulfúrico diluido, siendo el etanol un inhibidor ligeramente más efectivo que el metanol. Este efecto se evidencia tanto sobre el aumento de la extensión del período de inducción como sobre la disminución de la velocidad de reacción (Pekkarinen y Soimakallio, 1968).

El comportamiento observado puede ser explicado si se considera que el alcohol puede reaccionar con algún intermediario formado durante el proceso de oxidación, en forma análoga a un antioxidante. Según Pekkarinen y Soimakallio (1968) el mecanismo de acción del etanol es el siguiente:



La etapa (1) indica la reacción del etanol con un radical peróxido. La etapa (2) de la reacción muestra la acción del radical EtO· formado sobre el ácido sórbico (RH). Por lo tanto, el alcohol puede reaccionar con un radical peróxido, interrumpiéndose la cadena de reacciones que conducen a la oxidación del sorbato (Pekkarinen y Soimakallio, 1968).

4.1.3 - Influencia de la degradación del ácido sórbico sobre el pardeamiento no enzimático

En la degradación oxidativa del ácido sórbico se forman compuestos carbonílicos, los que conducen a reacciones de pardeamiento, ya sea porque estos se polimerizan o por que reaccionan con otros componentes del sistema como azúcares y aminoácidos siguiendo diferentes vías de reacción (caramelización, Maillard).

En base a lo comentado, resulta pertinente hacer una revisión acerca de las diferentes reacciones que provocan el pardeamiento no enzimático.

4.1.3.1 - Reacciones de pardeamiento no enzimático

Con la denominación de *pardeamiento no enzimático* se designa a un conjunto de reacciones muy complejas que conducen a la formación de pigmentos pardos, así como a modificaciones favorables o no del olor y sabor (Cheftel y Cheftel, 1976).

El tipo más frecuente de reacciones de pardeamiento, conocido como reacción de Maillard, es el que involucra grupos carbonilo y grupos amino y, en general, incluye las reacciones de aldehídos, cetonas y azúcares reductores con aminas, aminoácidos, péptidos y proteínas. Otro tipo, llamado caramelización, ocurre cuando compuestos polihidroxycarbonílicos (azúcares, ácidos polihidroxycarbonílicos) se calientan en ausencia de aminoácidos. Este tipo de reacciones suele requerir más energía para desarrollarse que las reacciones carbonilo - amina.

Un tercer tipo de pardeamiento, lo constituyen las reacciones oxidativas que convierten al ácido ascórbico y los polifenoles en compuestos di y policarbonílicos.

En todos los casos, los compuestos que provocan pardeamiento contienen un grupo carbonilo, o bien éste puede ser potencialmente generado.

Las principales reacciones que generan grupos carbonilo o sea, el sustrato para reacciones de pardeamiento son:

- * La degradación del ácido sórbico.
- * La hidrólisis de disacáridos.
- * La oxidación de lípidos.
- * La oxidación de alcoholes y polifenoles.

Las reacciones de pardeamiento ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos y constituyen una de las principales causas de deterioro físico-químico. Sus efectos son múltiples, entre ellos podemos nombrar:

- cambios de color debido a la formación de compuestos pardos y a la destrucción de pigmentos (Meschter, 1953).
- producción de sabores y aromas extraños (Pokorny, 1980).
- pérdida de valor nutritivo, al dañarse aminoácidos esenciales como la L-lisina (Mauron, 1981) o vitaminas como el ácido ascórbico. (Clegg, 1964).
- liberación de dióxido de carbono (Cole, 1967).
- descenso de pH (Ellis, 1959).
- pérdida de solubilidad de proteínas con los consiguientes cambios en la textura y alteración en el poder de reconstitución de alimentos deshidratados (Labuza y col., 1977).

- producción de metabolitos de potencial acción tóxica (Powrie y col., 1981).

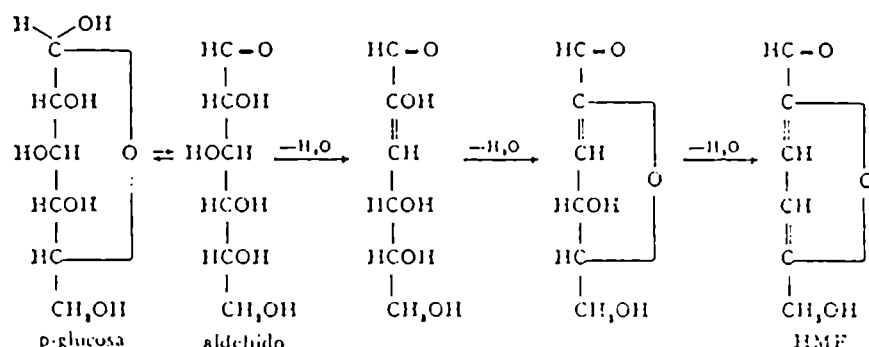
Sin embargo, en algunos casos, las reacciones de pardeamiento no enzimático son beneficiosas. Por ejemplo en la cocción de pan, carne y en la fabricación de dulce de leche, salsa de soja, estas reacciones son las responsables del color y aroma que caracteriza a dichos alimentos.

Por otra parte, algunos compuestos formados durante las reacciones de pardeamiento no enzimático parecen tener la facultad de proteger a los lípidos de la oxidación (Lingnert y Eriksson, (1980).

4.1.3.1.1 - Esquema general y etapas de las reacciones de pardeamiento no enzimático

a) Caramelización de azúcares

Cuando se calientan azúcares en forma anhidra o en solución, estos se descomponen formándose pigmentos pardos de naturaleza polimérica. Esta descomposición involucra un grupo de reacciones que comienzan con la apertura del anillo hemiacetalico de los azúcares reductores y la enolización de los mismos; luego ocurren una serie de transformaciones entre las que se incluyen reacciones de isomerización, deshidratación, fragmentación y oxidación. Esta serie de reacciones es catalizada por ácidos y bases. En medio ácido, predomina la deshidratación y los principales intermediarios son derivados del furfural, el cual se forma a partir de las pentosas. A partir de hexosas, se produce 5-hidroximetilfurfural (HMF) según se indica en la siguiente secuencia de reacciones:



(Braverman, 1963)

En medio alcalino, las reacciones de enolización se ven favorecidas y se forman rápidamente pigmentos pardos.

b) Reacción de Maillard

Las etapas iniciales de la reacción de Maillard siguen la misma secuencia que la caramelización, pero los aminoácidos y péptidos reaccionantes condensan con el azúcar y actúan como catalizadores internos en las reacciones de deshidratación y enolización posteriores de forma tal, que la velocidad de la reacción global resulta acelerada. Por esta razón, se considera que las reacciones de caramelización solamente tienen importancia durante el calentamiento de azúcares a alta temperatura o bien en soluciones muy concentradas (Shaw y col., 1967).

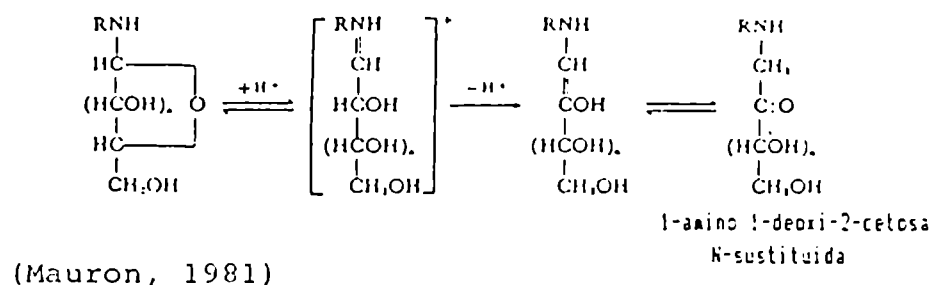
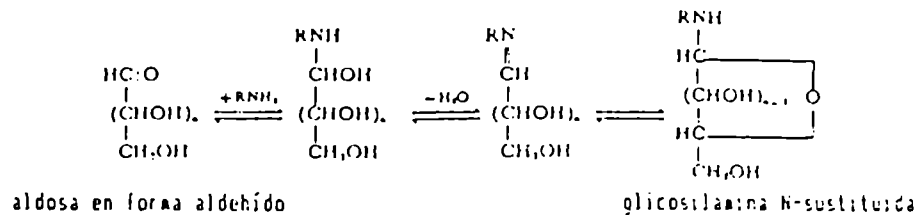
Si bien la secuencia de reacciones involucradas es muy compleja, ésta se puede esquematizar en la siguiente forma (Hodge, 1953; Hodge y Osman, 1976):

1) Etapa inicial (se forman productos incoloros sin absorción en la región ultravioleta cercana del espectro)

a) condensación azúcar - amino

b) reordenamiento de Amadori

La secuencia de reacciones en esta etapa es la siguiente:



Si se parte de glucosa, a través del reordenamiento de Amadori se forma una fructosamina, la misma puede reaccionar con una segunda molécula de glucosa para dar difructosamina.

2) Etapa intermedia (se forman productos incoloros o amarillo pálido con fuerte absorción en la zona ultravioleta del espectro).

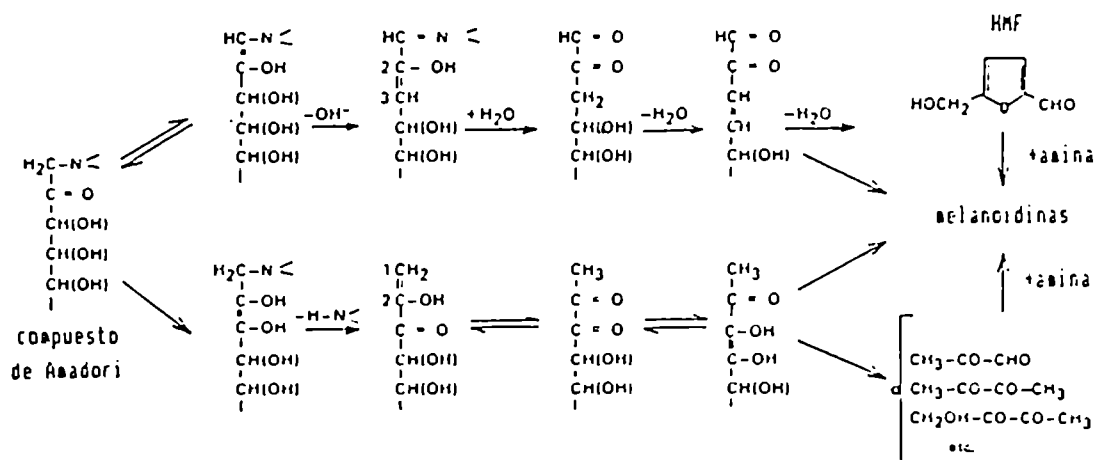
- c) deshidratación de azúcares
- d) fragmentación de azúcares
- e) degradación de aminoácidos

3) Etapa final (formación de productos coloreados)

f) condensación aldólica

g) polimerización aldehído - amina con formación de compuestos heterocíclicos que poseen nitrógeno en su composición.

En el siguiente esquema se muestra, en forma simplificada, la secuencia de reacciones de las dos últimas etapas.

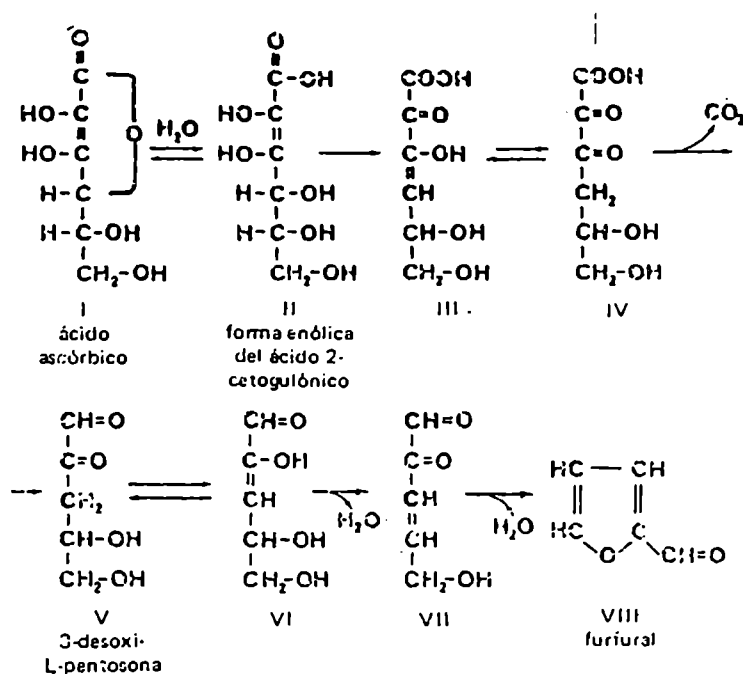


(Hodge y Osman, 1976)

Como consecuencia de esta serie de reacciones se forma 5-hidroxi-metilfurfural (HMF), se desprende CO₂, y, en condiciones aerobias, puede consumirse O₂. Como ya se mencionó, otros componentes presentes en el alimento tales como los compuestos carbonílicos provenientes de la oxidación de lípidos (Suyama y Adachi, 1979; Doyon y Smyrl, 1983) o los formados durante la destrucción del ácido sórbico pueden ser sustrato de la reacción de Maillard. En este último caso, se ha reportado que los compuestos carbonílicos generados por la oxidación del ácido sórbico y la glicina poseen un mayor potencial formador de pigmentos pardos que la combinación glucosa - glicina (Buera, 1986).

c) Pardeamiento del ácido ascórbico

La degradación del ácido ascórbico y, en paralelo, el pardeamiento que se origina pueden producirse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. El siguiente esquema sintetiza la secuencia de reacciones que conducen a la formación de pigmentos pardos:



4.1.3.1.2 - Evaluación del pardeamiento no enzimático

El grado de avance de las reacciones que conducen al pardeamiento ha sido evaluado de diferentes maneras. Algunos de los numerosos métodos empleados han sido:

- * determinación de la velocidad con que desaparecen los reactivos, mediante diversas técnicas (cromatografía gaseosa, métodos enzimáticos, etc.) (Buera, 1986).

- * determinación de la concentración de compuestos intermediarios tales como 5-hidroximetilfurfural (Resnik y Chirife, 1979).

- * medición del grado de pardeamiento, ya sea a través de la densidad óptica o del color (Petriella, 1986; Buera, 1986).

La medición de la densidad óptica entre 390 y 500 nm ha sido una de las técnicas más empleadas para evaluar el desarrollo de pardeamiento en alimentos o en sistemas modelo líquidos. No obstante, esta técnica no puede ser considerada una medida absoluta del grado de reacción debido a que el color marrón no presenta un máximo característico y por lo tanto, no absorbe a una longitud de onda determinada. Además, las conclusiones obtenidas a partir de la medición de la absorbancia pueden diferir de las obtenidas a partir de otras medidas por:

i) Formación de insaturaciones y/o conjugaciones sin que haya formación de pigmentos.

ii) Presencia de sustancias que afecten la curva de transmitancia espectral, por ejemplo, el anión bisulfito.

4.1.3.1.3 - Reacciones de pardeamiento inducidas por los sorbatos y/o por sus productos de degradación

Las reacciones de pardeamiento no enzimático inducidas por la presencia del ácido sórbico y/o por sus productos de degradación han sido motivo de estudio de diversos autores, que analizaron el efecto de distintas variables sobre el desarrollo del pardeamiento. En la Tabla 4.2, se resumen los factores estudiados en los diferentes trabajos.

En general, las reacciones de pardeamiento inducidas por los productos de degradación de los sorbatos han sido evaluadas a través del aumento de la absorbancia a 420 nm (Seow y Cheah, 1985, a y b; Obanu y Ledward, 1981; Thakur y Arya, 1991). Distintos autores encontraron que este parámetro varía en forma lineal con el tiempo:

$$d \text{ Abs}_{420} / dt = k_A$$

donde: Abs_{420} = absorbancia a 420 nm
t = tiempo
 k_A = constante (abs/t)

De forma tal que se postula que la cinética de esta reacción es de orden cero. Este comportamiento cinético es coincidente con el reportado para otras reacciones de pardeamiento (Mizrahi y col., 1970; Warmbier y col., 1976; Labuza y Stalmarch, 1980; Stamp y Labuza, 1983).

Tabla 4.2: Variables que afectan el desarrollo de pardeamiento inducido por la degradación del ácido sórbico según bibliografía.

Sustrato	Variables	Autor
homogenatos de fruta, pasta de pescado	material de empaque, concentración de sorbato de potasio	Vidyasagar y Arya (1984)
soluciones acuosas	a_w , temperatura, Co^{2+}	Seow y Cheah (1985, a)
soluciones acuosas	a_w , temperatura, glicerol, glicina	Seow y Cheah (1985, b)
soluciones acuosas de a_w 0,94	temperatura	Gerschenson y col. (1986)
soluciones acuosas	concentración de sorbato, NaCl, glicerol, oxígeno	Obanu y Ledward (1986)
soluciones acuosas de a_w 0,90	concentración de sorbato, glicina, glucosa	Buera y col. (1986)
soluciones acuosas	glicina, Cu^{2+}	Arya y Thakur (1988)
soluciones acuosas, homogenatos de fruta, sistemas sólidos	glicina, lisina, Cu^{2+} material de empaque, a_w	Thakur y Arya (1991)

Cabe destacar que, Thakur y Arya (1991) reportaron la existencia de un período de inducción, después del cual la cinética de pardeamiento se ajusta al orden mencionado. En trabajos previos en los que se estudió el pardeamiento de sistemas formados por glucosa y glicina, también se encontró un período inicial de inducción (Song y col., 1966; Warmbier y col., 1976).

Según Seow y Cheah (1985, a), la dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura en el rango entre 40 y 60 °C sigue el modelo de Arrhenius y las energías de activación se encuentran en el rango comprendido entre 15 - 22 kcal/mol. Estos valores son de la misma magnitud que los reportados para otras reacciones de pardeamiento no enzimático en sistemas modelo (Song y col., 1966; Labuza, 1980).

4.1.3.1.4 - Factores que afectan a las reacciones de pardeamiento no enzimático, con especial referencia al pardeamiento asociado con la destrucción de los sorbatos

En esta sección se analizarán los principales factores que influyen sobre la velocidad de las reacciones de pardeamiento, con especial referencia al caso de las reacciones de pardeamiento asociadas con la destrucción de los sorbatos.

a) Temperatura

Un aumento de temperatura acelera el desarrollo de pardeamiento. Esto se debe a que el calor favorece cada una de las reacciones involucradas en la formación de pigmentos pardos. Por ejemplo, induce la apertura de los anillos hemiacetálicos de los azúcares, que constituye el primer paso de las reacciones de pardeamiento. Además, favorece las diferentes reacciones que conducen a la formación de carbonilos reactivos, entre ellas, la destrucción del sorbato.

b) Concentración de sorbato

Obanu y Ledward (1986) estudiaron el pardeamiento no enzimático de soluciones que contenían: 10,0 % de lisina, 40,0 % de glicerol, 9,5 % NaCl, y sorbato de potasio en diferentes concentraciones (0 %, 0,1%, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % y 0,5 %). Ellos observaron que la disminución de la extensión del período de inducción y el aumento de la velocidad de pardeamiento eran proporcionales a la concentración de sorbato.

Vidyasagar y Arya (1984), también reportaron la misma tendencia al estudiar el pardeamiento de homogenatos de fruta. En este caso, la adición de 0,1 % de sorbato no influenciaba significativamente el desarrollo del pardeamiento, mientras que el empleo de 0,2 % de sorbato ejercía un efecto acelerante.

Los resultados comentados son los esperados, ya que, conforme se incrementa la concentración de sorbatos, se eleva la concentración de compuestos carbonílicos (formados por la degradación del preservador) que podrían participar en reacciones de pardeamiento no enzimático.

c) Oxígeno

En las reacciones de pardeamiento asociadas con la oxidación del sorbato, la presencia de oxígeno parecería ser un factor esencial. Por ejemplo, se observó que si se excluía el aire de soluciones que contenían 10 % de lisina y 0,5 % de sorbato de potasio, el pardeamiento se inhibía, mientras que una solución que contenía 10 % de lisina y 0,5 % de glucosa se pardeaba aproximadamente a igual velocidad que en presencia de oxígeno (Obanu y Ledward, 1986).

d) pH

El efecto del pH es complejo, ya que cada una de las reacciones que intervienen en el pardeamiento tiene su propio pH óptimo; 6,0 a 8,0 para la condensación de Maillard; cercano a 7,0 para la reestructuración de Amadori; 5,5, para la degradación de cetosaminas por enolización (Cheftel y Cheftel, 1976). En el caso del pardeamiento del ácido ascórbico, el pH óptimo es cercano a 4,0.

El pH del medio también determina la concentración de las formas en equilibrio de los aminocompuestos y, dado que solamente la forma aniónica de éstos puede combinarse con azúcares reductores, el grado de reacción depende marcadamente del pH (Katchalsky y Sharon, 1953).

Por otra parte, ciertas reacciones generadoras de grupos carbonilo reactivos como, por ejemplo, la hidrólisis de disacáridos o la oxidación del ácido sórbico, se ven favorecidas a pH ácido.

e) Buffers

Durante el transcurso de las reacciones de pardeamiento se verifica un descenso del pH. En el caso de la caramelización de

azúcares, éste se debe a la formación de compuestos de naturaleza ácida. Cuando el pardeamiento se debe a la reacción de Maillard, se adiciona la remoción de grupos amino, al efecto ya mencionado.

En condiciones levemente alcalinas, la adición de un buffer reduce la caída de pH y, por ende, tiene un efecto acelerante sobre la velocidad de formación de pigmentos (Saunders y Jervis, 1966). Esto explicaría la acción acelerante sobre la reacción, de los citratos y fosfatos (Hodge, 1953).

f) Actividad de agua

Como se aprecia en la Figura 4.1, la velocidad de las reacciones de deterioro está fuertemente influenciada por la actividad de agua. En el caso de las reacciones de pardeamiento no enzimático se observa que el efecto depende, además, del estado de agregación del alimento. En sistemas sólidos, la velocidad de la reacción de pardeamiento no enzimático en función de la actividad de agua presenta un máximo entre 0,6 y 0,8 unidades de a_w (Labuza y Saltmarch, 1980). Ello se muestra en la Figura 4.2.

Este comportamiento es debido a que, a bajas actividades de agua, el factor limitante es la escasa movilidad de los reactivos y, por ende, la reacción se ve minimizada. Conforme aumenta la actividad de agua, ocurren dos fenómenos: disminución de la viscosidad de la fase acuosa y la disolución de los reactivos en dicha fase (Warmbier y col, 1976; Labuza, 1980). Como consecuencia de estos fenómenos, se produce un incremento gradual de la concentración de los reactivos y de su velocidad de difusión. Esto se traduce en un aumento de la velocidad de reacción. Sin embargo, llega un momento en que disminuye la disponibilidad de los reactivos y, por lo tanto, un aumento en la actividad de agua provoca una dilución del sistema. Este efecto sumado al hecho de que el agua, por ser un producto de la reacción, tiene una acción inhibitoria sobre la misma, provoca una disminución en la velocidad de reacción (Labuza y col, 1977; Labuza y Saltmarch, 1980).

Dado que, en un sistema líquido ni la viscosidad ni la disolución de los reactivos son factores limitantes, se verifica una gradual disminución de la velocidad de reacción conforme se incrementa la actividad de agua debido a que el agua (producto de la reacción) tiene un efecto inhibitorio (Loncin y col, 1965; Eichner y Karel, 1972). En particular, el efecto de la actividad de agua en el rango de 0,90 - 0,95 unidades de a_w sobre la reacción de Maillard es escaso, como consecuencia de la forma asintótica de la curva presentada en la Figura 4.2 (Petriella, 1986).

Figura 4.1: Mapa de estabilidad de los alimentos (Labuza, 1980) 1970).

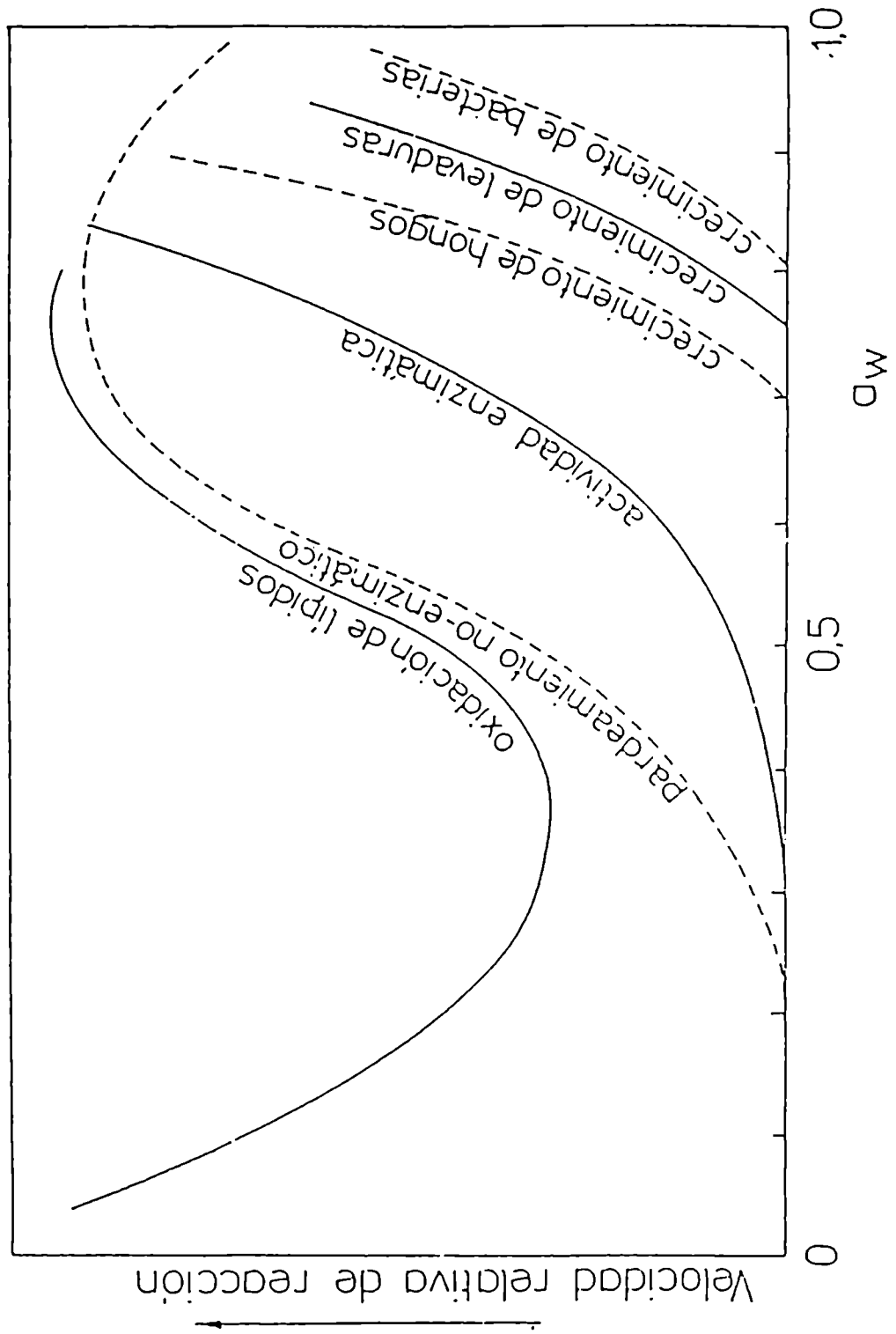
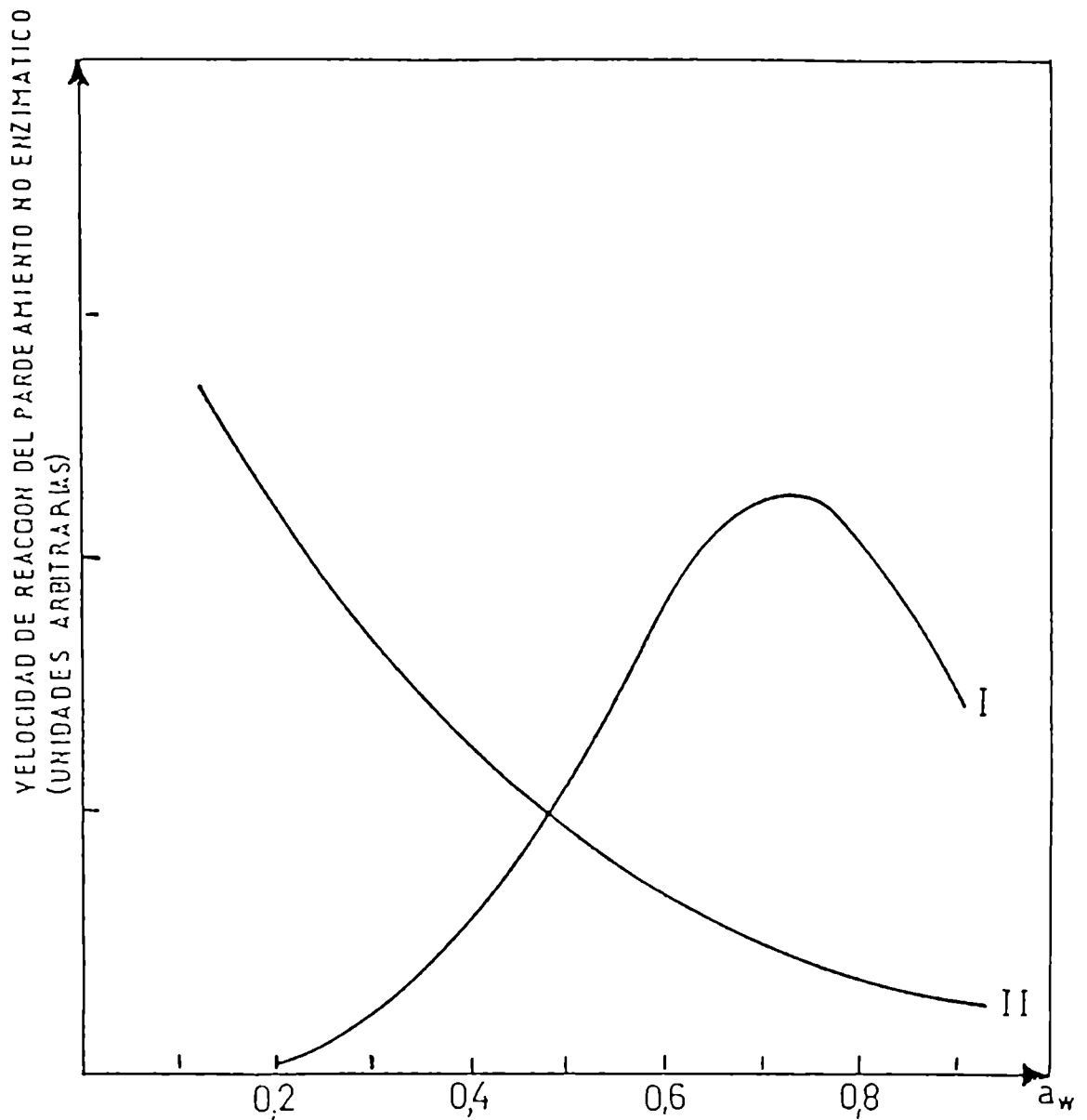


Figura 4.2: Dependencia de la velocidad de pardeamiento no enzimático en función de la actividad de agua.

I. Alimentos y sistemas sólidos (Labuza y Stalmarch, 1980).

II. Alimentos y sistemas líquidos (Loncin y col., 1965).



Seow y Cheah (1985, a y b) estudiaron la reactividad del sorbato y del glicerol en el desarrollo del pardeamiento no enzimático en sistemas modelo líquidos a 40, 50 y 60 °C en el rango de actividades de agua comprendido entre 0,55 y 0,90. Ellos encontraron que la velocidad de pardeamiento disminuía a medida que aumentaba la actividad de agua, lo que coincide con lo explicado para un sistema líquido.

Thakur y Arya (1991) reportaron que la velocidad de pardeamiento presentaba un máximo a 0,73 en sistemas sólidos formados por celulosa microcristalina, ácido sórbico y glicina. La presencia de este máximo es característica del pardeamiento no enzimático de sistemas sólidos.

En cuanto a la sensibilidad de la reacción frente a la modificación de la actividad de agua, Seow y Cheah (1985, b) reportaron que, ésta aumentaba al disminuirse la actividad de agua. La misma tendencia se observó en el pardeamiento no enzimático de papas (Hendel y col., 1955) y repollo liofilizado (Mizrahi y col., 1970).

g) Polioles y sales

Petriella (1986) estudió el efecto de diversos polioles y sales en la cinética de pardeamiento no enzimático de soluciones de glucosa y lisina de alta actividad de agua. Este autor comparó la reactividad de diversos polioles (glicerol, sorbitol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, polietilenglicol) y halló que no se producían cambios significativos en la velocidad de pardeamiento en función del poliol empleado. Sin embargo, la extensión del período de inducción se veía afectada. Asimismo, el efecto del cambio de pH y la sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura diferían en función del humectante adicionado.

En cuanto al efecto de distintos cloruros alcalinos, este autor, reportó la existencia de un efecto específico del catión sobre la velocidad de pardeamiento, ya que ésta disminuye conforme se incrementa el radio iónico hidratado del catión.

En relación al efecto de los polioles y las sales usadas para deprimir la actividad de agua, es de destacar las notorias diferencias en la velocidad de reacción según se emplee glicerol o KCl. El KCl tiene una acción inhibitoria específica sobre el pardeamiento, la cual se incrementa notablemente al disminuir el pH, y en menor grado, la temperatura y la a_w (Petriella, 1986).

Obanu y col. (1977) informaron que el glicerol participa en reacciones de pardeamiento al reaccionar con aminoácidos o proteínas,

e inclusive él mismo se puede oxidar, debido a una prolongada exposición al aire formando compuestos pardos. Sin embargo, cuando Seow y Cheah (1985, b) estudiaron el potencial de pardeamiento del glicerol en sistemas con sorbato y glicina a a_w 0,80 y a 40, 50 y 60 °C encontraron que: a) El glicerol por sí mismo no se pardea inclusive expuesto a 60 °C durante 32 días, b) La velocidad de pardeamiento se incrementa en el orden: agua/glicerol/glicina < agua/glicerol/sorbato < agua/glicerol/sorbato/glicina. En base a estos resultados concluyeron que la reacción entre glicina y sorbato (o los productos de oxidación de este último) poseen un mayor potencial de pardeamiento que la reacción entre glicerol y sorbato o entre glicerol y glicina. Sin embargo, el pardeamiento no enzimático generado por las dos últimas reacciones mencionadas debe ser tenido en cuenta, en especial a altas temperaturas.

Obanu y Ledward (1986), al estudiar la reactividad del sorbato y del glicerol en sistemas modelo acuosos encontraron que la velocidad de pardeamiento de una solución que contenía 30,0 % de glicerol, 0,5 % de sorbato de potasio y NaCl ($a_w = 0,85$) era menor a la de un sistema que contenía 0,5 % de sorbato de potasio y NaCl ($a_w = 0,85$) Es de destacar que en el primer caso, la cantidad de NaCl necesaria para deprimir la a_w es menor debido a la presencia de glicerol. En función de estos resultados, los autores concluyen que el NaCl podría exaltar las reacciones de pardeamiento no enzimático.

h) Amino-compuestos

Thakur y Arya (1991) estudiaron la influencia de la presencia de glicina y lisina en el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático en sistemas líquidos y sólidos que contenían ácido sórbico y azúcares (glucosa y sacarosa) y en homogenatos de frutas. Ellos encontraron que la presencia de aminoácidos aceleraba la velocidad de pardeamiento, siendo la lisina más activa que la glicina. Además, observaron que la velocidad de pardeamiento era muy baja en presencia de los aminoácidos o del ácido sórbico por separado. Esto indicaría que los productos de degradación del ácido sórbico en presencia de aminoácidos desempeñan un papel importante en el desarrollo de pardeamiento. Arya (1980) y Seow y Cheah (1985, b) habían reportado previamente que la presencia de aminoácidos incrementaba la velocidad de pardeamiento.

En general, se ha aceptado que la velocidad de pardeamiento de los amino-compuestos es mayor para los aminoácidos que para los péptidos y mayor para éstos que para las proteínas (Chuyen y col., 1973). Sin embargo, en diferentes trabajos se ha establecido que este orden de reactividad dependería del pH del medio debido a que los aminoácidos y péptidos reaccionan con los compuestos carbonílicos en su forma aniónica (Chuyen y col., 1973; Buera, 1986).

En cuanto al estudio del pardeamiento de soluciones acuosas formadas por glucosa y glicina, diglicina o triglicina a diferentes valores de pH, se reportó que, por debajo del punto isoeléctrico (pH cercano a 6 tanto para el aminoácido como para los péptidos), los péptidos desarrollaban una mayor velocidad de pardeamiento que los aminoácidos. Ello se debe a que poseen una concentración de forma aniónica más grande ya que el valor de su segunda constante de acidez es mayor. Además, la escisión del enlace peptídico aumentaría la concentración de grupos reactivos. A pH por encima del punto isoeléctrico, el aminoácido desarrolla una mayor velocidad de pardeamiento. En este caso, la concentración de forma aniónica no es el factor limitante y sí lo es, la concentración de forma salina (protonada), que es requerida en una etapa posterior de la reacción (Buera, 1986).

Los resultados comentados indican que la velocidad de pardeamiento no depende solamente del tipo de amino-compuesto, sino también de otros factores que condicionan su reactividad.

i) Azúcares

En cuanto a la caramelización, los azúcares con conformación piranósica dan menor formación de color que los de conformación furanósica debido a la mayor facilidad de esta conformación para que ocurra la apertura del anillo hemiacetalico, el cual constituye el primer cambio estructural en la serie de reacciones que conducen al pardeamiento. Las pentosas son, así, más reactivas que las hexosas. Este comportamiento está relacionado con la estabilidad relativa de los azúcares (Buera, 1986).

En relación a los disacáridos no reductores, estos deben hidrolizarse primero para poder participar en reacciones de pardeamiento. Los disacáridos de mayor importancia en cuanto a su presencia en alimentos son lactosa, maltosa y sacarosa. Se ha reportado que la sacarosa se hidroliza a una velocidad mil veces mayor que la maltosa y lactosa (Buera, 1986). Debido a esto, la sacarosa es el disacárido de mayor importancia en cuanto a su incidencia en el pardeamiento.

j) Metales

Thakur y Arya (1991) encontraron que la inclusión de cobre en soluciones acuosas que contenían azúcares (glucosa, sacarosa), aminoácidos y ácido sórbico disminuía la velocidad de pardeamiento.

Seow y Cheah (1985, a) encontraron que la adición de Co^{2+} disminuía la degradación del sorbato y la velocidad de pardeamiento,

en soluciones de glicerol. Por lo tanto, se podría concluir que la menor velocidad de degradación de los sorbatos determinaría la menor velocidad de pardeamiento no enzimático observada en presencia de cobalto.

4.2 - OBJETIVOS

En este capítulo se analizará la influencia de distintos parámetros en la cinética de degradación del sorbato en sistemas acuosos de actividad de agua reducida (a_w 0,91) que modelan la composición de un producto alimenticio de alta humedad, a fin de determinar cuales son las condiciones en las que el preservador presenta mayor estabilidad. También se analizará la influencia de la degradación sobre el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático.

4.3 - MATERIALES Y METODOS

4.3.1 - Sistemas modelo

Con el objetivo de evaluar en forma independiente los distintos parámetros que afectan la estabilidad del ácido sórbico se trabajó con sistemas modelo. Los mismos fueron formulados en orden de complejidad creciente.

Se usó un sistema base formado por una solución acuosa de sorbato de potasio (0,20 %, m/m). Al mismo se le deprimió la a_w a 0,91 y se ajustó el pH a 5,0 ó 6,0 por adición de ácido ortofósforico. Se eligió el empleo de este ácido ya que dentro de los posibles acidificantes usualmente empleados en alimentos, éste es el que otorga un menor sabor a "ácido" al producto (Argaíz y col., 1993).

Los sistemas a analizar consideraron la utilización de:

- a) distintos humectantes.
- b) distintos humectantes y glicina.
- c) mezcla de humectantes seleccionada y distintos aditivos.
- d) mezcla de humectantes seleccionada, glicina y distintos aditivos.

Además, con el objetivo de evaluar la contribución de los productos de degradación del sorbato a las reacciones de pardeamiento no enzimático, se analizaron algunos sistemas sin sorbato.

Los solutos seleccionados para deprimir la a_w a 0,91 fueron:

- NaCl.
- glicerina.
- NaCl (3,50 % m/m) y glicerina.
- NaCl (2,45 % m/m), KCl (1,05 % m/m) y glicerina.

Estos solutos son los usualmente empleados en la elaboración de carnes de humedad intermedia (Ledward, 1981).

Se eligió trabajar con una concentración de NaCl de 3,5 % (m/m), debido a que la misma es adecuada en cuanto a la palatabilidad (Ledward, 1986).

El reemplazo parcial de NaCl por KCl se realizó con la finalidad de formular un sistema con bajo contenido en Na⁺.

La concentración de glicina usada (0,76 %, m/m) corresponde a la concentración de dicho aminoácido en la carne vacuna (Montes, 1966).

Los aditivos seleccionados fueron: NaNO₂, sacarosa, polifosfatos, ácido ascórbico, propilgalato, EDTA.

4.3.1.1 - Cálculo de la actividad de agua

Como primer paso en la formulación de los sistemas modelo fue necesario determinar las cantidades de humectante requeridas para lograr la disminución de a_w deseada. Dicho cálculo se realizó mediante la aplicación de la ecuación de Ross (1975) descripta en el Apéndice de "Predicción de la actividad de agua":

$$a_w = \prod_i a_{wi} \quad (4.1)$$

donde: a_w = actividad de agua de la solución.
 a_{wi} = actividad de agua de cada componente calculada a la misma molalidad que en la mezcla.

Los valores de a_{wi} fueron calculados, para el caso del NaCl y KCl a partir de tablas en las que se encuentra expresada la actividad de agua en función del porcentaje en peso del compuesto (Ferro Fontán y Col., 1979).

Para otros componentes del alimento (sorbato de potasio, glicina, polifosfatos), los valores de a_{wi} se calcularon mediante la ecuación de Raoult:

$$a_{wi} = X_w = \frac{n_1}{n_1 + n_2} \quad (4.2)$$

donde: a_{wi} = actividad de agua de componente i
 X_w = fracción molar de agua
 n_1 = número de moles de agua
 n_2 = número de moles del componente i

El valor de a_w del NaNO_2 , ácido ascórbico y del EDTA se consideró igual a 1, debido a su baja concentración en los sistemas modelo.

Para el glicerol y la sacarosa, el cálculo de a_{wi} se realizó a través de la ecuación de Norrish (1966):

$$a_{wi} = X_1 \cdot \exp(-K \cdot X_2^2) \quad (4.3)$$

donde: X_1 = fracción molar de agua
 X_2 = fracción molar del componente i
 K = constante de Norrish

Los valores de K utilizados fueron (Chirife y Col., 1980):

- glicerol	$K = 1,16$
- sacarosa	$K = 6,47$

Con las cantidades así calculadas se prepararon los distintos sistemas modelo de a_w reducida (0,91), verificándose luego en forma experimental que la a_w predicha coincidiera con la a_w real.

4.3.1.2 - Composición de los sistemas modelo

La composición de los sistemas modelo estudiados se detalla en las Tablas 4.3, 4.4 y 4.5.

Los reactivos utilizados fueron:

- Acido ascórbico (Merck).
- Acido cítrico (Merck).
- Acido etilendiamino-tetraacético (Merck).
- Acido ortofosfórico (Merck).
- Cloruro de potasio (Merck).
- Cloruro de sodio (Mallinckrodt).
- Glicerol (Merck).
- Glicina (Mallinckrodt).
- Nitrito de sodio (Mallinckrodt).
- Polifosfatos (Farmesa).
- Propilgalato (Sigma, U.S.A.).
- Sacarosa (Anedra).
- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A.).

Tabla 4.3: Composición de los sistemas modelo.

Sistema	aw	pH	Composición (% m/m)					
			agua	KS	NaCl	glicerol	glicina	KCl
1	1,00	5,0	99,80	0,200	----	-----	----	----
2	0,91	5,0	86,36	0,200	13,00	-----	----	----
3	0,91	5,0	68,36	0,200	----	31,44	----	----
4	0,91	5,0	72,25	0,200	3,50	24,05	----	----
5	0,91	5,0	71,80	0,200	2,45	24,50	----	1,05
6	0,91	6,0	86,36	0,200	13,00	-----	----	----
7	0,91	6,0	68,36	0,200	----	31,44	----	----
8	0,91	6,0	72,25	0,200	3,50	24,05	----	----
9	0,91	5,0	86,54	0,200	12,50	-----	0,760	----
10	0,91	5,0	69,54	0,200	----	29,50	0,760	----
11	0,91	5,0	73,54	0,200	3,50	22,00	0,760	----
12	0,91	6,0	73,54	0,200	3,50	22,00	0,760	----
13*	0,91	5,0	73,54	0,200	3,50	22,00	0,760	----

KS: sorbato de potasio

*: acidificado con ácido cítrico.

Tabla 4.4: Composición de los sistemas modelo.

Sistema	Composición (% m/m)										
	agua	KS	NaCl	glicerol	gly	N	PP	propil-galato	S	AA	EDTA
14	72,25	0,200	3,50	24,05	----	----	----	----	----	----	0,050
15	77,24	0,200	3,50	24,05	----	----	----	----	----	----	0,010
16	72,23	0,200	3,50	24,04	----	----	----	----	----	----	0,025
17	72,18	0,200	3,50	24,02	----	----	----	----	----	----	0,010
18	99,75	0,200	---	----	----	----	----	----	----	----	0,050
19	72,25	0,200	3,50	24,05	----	----	----	0,003	----	----	----
20	71,87	0,200	3,50	23,93	----	----	0,500	----	----	----	----
21	72,00	0,200	3,50	23,30	----	----	----	----	1,000	----	----
22	72,21	0,200	3,50	24,04	----	----	----	----	----	0,050	----
23	72,20	0,200	3,50	24,05	----	0,008	----	----	----	----	----
24	73,40	0,200	3,50	21,14	0,760	----	----	----	1,000	----	----
25	73,50	0,200	3,50	21,99	0,760	----	----	----	----	0,050	----
26	73,44	0,200	3,50	21,60	0,760	----	0,500	----	----	----	----
27	74,04	0,200	3,50	20,00	0,760	----	0,500	----	1,000	----	----
28	73,36	0,200	3,50	21,13	0,760	----	----	----	1,000	0,050	----
29	74,79	0,200	3,50	20,20	0,760	----	0,500	----	----	0,050	----
30	74,00	0,200	3,50	19,99	0,760	----	0,500	----	1,000	0,050	----
31	73,53	0,200	3,50	22,00	0,760	0,008	----	----	----	----	----
32	73,54	0,200	3,50	22,00	0,760	0,004	----	----	----	----	----
33	73,53	0,200	3,50	22,00	0,760	0,012	----	----	----	----	----
34	73,39	0,200	3,50	21,14	0,760	0,008	----	----	1,000	----	----
35	73,49	0,200	3,50	21,99	0,760	0,008	----	----	----	0,050	----
36	73,43	0,200	3,50	21,60	0,760	0,008	0,500	----	----	----	----
37	73,35	0,200	3,50	20,13	0,760	0,008	----	----	1,000	0,050	----
38	74,78	0,200	3,50	20,20	0,760	0,008	0,500	----	----	0,050	----
39	74,03	0,200	3,50	20,00	0,760	0,008	0,500	----	1,000	----	----
40	73,99	0,200	3,50	19,99	0,760	0,008	0,500	----	1,000	0,050	----

KS: sorbato de potasio; gly: glicina; N: nitrito de sodio; PP: polifosfatos; S: sacarosa; AA: ácido ascórbico. El pH de todos los sistemas es 5,0.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0,91, con excepción del sistema 18 cuya actividad de agua es 1,00.

Tabla 4.5: Composición de los sistemas modelo.

Sistema	Composición (% m/m)							
	agua	KS	NaCl	glicerol	gly	PP	S	AA
41	68,50	----	----	31,50	----	----		
42	72,40	----	3,50	24,10	----	----		
43	69,24	----	----	30,00	0,760	----		
44	73,44	----	3,50	22,30	0,760	----		
45	73,83	----	3,50	22,62	----	----	----	0,050
46	73,10	----	3,50	22,40	----	----	1,000	----
47	73,56	----	3,50	21,18	0,760	----	1,000	----
48	73,69	----	3,50	22,00	0,760	----	----	0,050
49	73,59	----	3,50	21,65	0,760	0,500	----	----
50	73,29	----	3,50	21,40	0,760	----	1,000	0,050
51	74,20	----	3,50	20,04	0,760	0,500	1,000	----
52	74,95	----	3,50	20,24	0,760	0,500	----	0,050
53	74,09	----	3,50	20,01	0,760	0,500	1,000	0,050

KS: sorbato de potasio; gly: glicina; PP: polifosfatos; S: sacarosa; AA: ácido ascórbico.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0,91.

El pH de todos los sistemas es 5,00.

4.3.1.3 - Preparación de los sistemas modelo

Los sistemas modelo se prepararon por pesada de los distintos componentes, luego se agitó el sistema mediante un agitador magnético (Julabo, U.S.A.) para facilitar la disolución, y se ajustó el pH a 5,0 ó 6,0 por agregado de gotas de una solución de ácido ortofosfórico al 50 % (v/v) (con excepción del sistema 13 en el que se empleó ácido cítrico como acidificante).

Para la determinación de pH se empleó un electrodo de vidrio unido a un pHmetro Metrohm modelo E 632, previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. El error en la determinación del pH fue de 0,02 unidades de pH.

Luego de preparados los sistemas, se tomaron alícuotas de 10,0 g y se colocaron en frascos de vidrio de 40 ml de capacidad, de manera tal que el espacio de cabeza fuera el mismo en todos los casos (75 % del volumen total del frasco). Los frascos se cerraron herméticamente para prevenir la evaporación y se envolvieron en papel aluminio para evitar la acción prooxidante de la luz. En el caso en que se analizó el efecto del material de empaque, se utilizaron además frascos de polietileno de alta densidad de un espesor de 0,9 mm.

4.3.1.4 - Medición de la actividad de agua de los sistemas formulados

La determinación de la actividad de agua de las muestras se realizó en un higrómetro Novasina Thermoconstanter Humidat TH2 (Novasina AG, C -8050 Zurich, Suiza) a temperatura constante de 25 °C ± 0,05 °C. El procedimiento para calibrar el equipo fue el descrito por Kitic y col. (1986) y consistió en realizar una curva de calibración con soluciones salinas saturadas de a_w conocida. Los valores de a_w a 25 °C de las soluciones tomadas como referencia, son los indicados a continuación (Resnik y col., 1984):

Solución salina saturada	a_w (25 °C)
KCl	0,843
BaCl ₂	0,902
KNO ₃	0,925
K ₂ SO ₄	0,972

Previo a la medición, las muestras fueron colocadas a 25 °C por un lapso de 6 h con el objetivo de equilibrar su temperatura. Cada muestra se midió por duplicado.

El error en la determinación experimental de la a_w es de $\pm 0,005$ unidades de a_w (Kitic y col., 1986).

4.3.2 - Condiciones de almacenamiento

Los sistemas modelo envasados se almacenaron por duplicado a 33,45 y 57 °C $\pm 0,5$ °C en cámaras de temperatura constante y convección forzada (Mettert 854 Schabach, Alemania). A distintos intervalos de tiempo se retiraron muestras del almacenamiento y se colocaron a -20 °C hasta el momento de su análisis, ya que ensayos previos indicaron que prolongados lapsos de tiempo en dichas condiciones no producían pérdidas detectables en el contenido de sorbato de potasio ni aumento en el grado de pardeamiento no enzimático. Con el objetivo de evaluar el efecto de temperaturas de procesamiento, uno de los sistemas estudiados también se almacenó a 70, 80 y 90 °C ($\pm 0,5$ °C).

4.3.3 - Determinación de ácido sórbico

El contenido de ácido sórbico se analizó mediante la técnica de oxidación de la A.O.A.C (1980), cuya descripción se realizó previamente en la sección 3.3.1.1. En presencia de nitrito de sodio se aplicó una técnica de cromatografía líquida de alta presión cuya descripción se mencionó en la sección 3.3.1.6. En todos los sistemas estudiados, las determinaciones se realizaron por duplicado y se informa el promedio obtenido.

4.3.4 - Determinación de hierro

El análisis del contenido de hierro se realizó solamente en algunos casos de particular interés. Este se hizo por espectrometría de absorción atómica en un equipo Shimadzu (AA-6501) (Tokio, Japón) provisto de un horno de grafito (GFA-6000) y de un tomador de muestra automático (ASC-6000). Previo a la medición se realizó una curva de calibración.

El error en las determinaciones fue de ± 5 %.

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los valores informados corresponden al promedio.

4.3.5 - Determinación del pardeamiento no enzimático

El pardeamiento no enzimático de los sistemas se evaluó a través de la absorbancia a 420 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 21 (Bausch y Lomb, Suiza). En la medición se empleó agua destilada como patrón de referencia.

El error en la determinación fue de $\pm 0,01$.

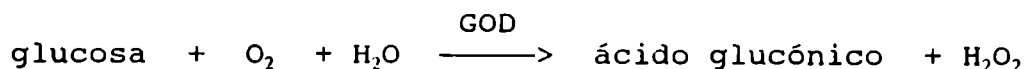
En todos los sistemas, la medición se realizó por duplicado y se informa su promedio.

Dado que se puede producir un aumento en la absorbancia a 420 nm debido a la formación de insaturaciones y/o conjugaciones sin que se produzca formación de pigmento (Spark, 1969), conjuntamente con la medición de absorbancia, se realizó una observación de las muestras analizadas con el objeto de determinar si el incremento de la absorbancia estaba en concordancia con el aumento de color.

4.3.6 Determinación del grado de hidrólisis de la sacarosa

El grado de hidrólisis de la sacarosa sólo se analizó en aquellos sistemas en los cuales presentó un particular interés. Para su determinación se cuantificó la cantidad de glucosa formada mediante la técnica de glicemia enzimática que se utiliza para el dosaje de "glucosa verdadera" en sangre y otros líquidos biológicos (Laboratorio Wiener, S.A.I.C. Rosario, Argentina).

En dicha técnica, la glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa-oxidasa (GOD - β D glucosa: oxígeno 1- oxidoreductasa; EC 1.1.3.4) a ácido glucónico y agua oxigenada. El H_2O_2 en presencia de peroxidasa (POD, Donador: hidrógeno-peróxido oxidoreductasa: EC 1.11.1.7) produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona (4-AF) dando lugar a la formación de un cromógeno rojo cereza con un máximo de absorción a 505 nm, según el siguiente esquema:



Los reactivos usados fueron:

- Glucosa, Mallinckrodt (U.S.A), solución estándar de 1 g/l. Estable a temperatura ambiente.
- GOD/POD: solución estabilizada de glucosa oxidasa (≥ 1000 U/ml) y peróxidasa (≥ 120 U/ml). Conservar refrigerada.
- Reactivo 4-AF: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en buffer TRIS 0.92 mol/l. Conservar refrigerada.
- Reactivo fenol: solución de fenol 55 mmol/l. Estable a temperatura ambiente.
- Reactivo de trabajo: se coloca en un matraz de 1000 ml, 500 ml de agua, 50 ml de reactivo 4-AF, 50 ml de reactivo fenol 55 nmol/l y 3 ml de GOD/POD, se lleva a volumen final de 1000 ml. En heladera y al abrigo de la luz es estable por 1 mes.

Para la medición, se toma una alícuota de muestra tal que su concentración de glucosa esté comprendida entre 0,05 y 0,10 % y se coloca en un tubo de ensayo al que se adiciona 2 ml del reactivo de trabajo. Se incuba en baño de agua a 37 °C durante 10 min. Luego, se enfría en baño de hielo y se determina la absorbancia del color rojo formado a 505 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch y Lomb, Suiza) contra un blanco del reactivo. La concentración de glucosa se calcula en relación a la absorbancia de una muestra estándar.

El color formado es estable durante 60 min y la reacción cumple la ley de Beer hasta 4,5 g/l de glucosa.

De acuerdo a información del laboratorio proveedor (Wiener Lab.), la reproducibilidad de la técnica es:

Nivel de glucosa	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
1,00 g/l	$\pm 0,022$ g/l	$\pm 2,37$
2,00 g/l	$\pm 0,030$ g/l	$\pm 1,50$

La recuperación de glucosa oscila entre 99 - 101 % para todo nivel de glucosa (Lab. Wiener).

4.3.7 - Análisis estadístico de los resultados

El cálculo de las constantes cinéticas (k) y de las energías de activación (E_a) de la degradación del sorbato y del pardeamiento no enzimático se realizó por regresión lineal de los datos.

En todos los casos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se calculó el coeficiente de determinación (R^2) con el objetivo de evaluar la significatividad de las regresiones.

Los errores de los parámetros cinéticos se expresaron en base a la desviación estándar (Sokal y Rohlf, 1969).

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las distintas constantes de velocidad y energías de activación se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para la igualdad de pendientes cuyo resultado se comparó con el parámetro "F" para un nivel de confianza del 95 % (Sokal y Rohlf, 1969).

En cuanto a las energías de activación, cabe mencionar que, en el caso de tener datos a tres temperaturas, su cálculo se realizó tomando en cuenta dos valores de cada constante de velocidad, los cuales surgen de considerar el extremo superior e inferior del intervalo de confianza calculado en base al parámetro "t" para el 95 % de confianza. Este procedimiento es recomendado por Labuza y Kamman (1983) para disminuir el error y aumentar la certidumbre en el cálculo de las energías de activación cuando sólo se dispone de datos a tres temperaturas.

En el caso de disponer de datos a seis temperaturas, el cálculo de la energía de activación se realizó tomando en consideración solamente el valor de la constante de velocidad obtenida a cada temperatura.

Con el objetivo de verificar la existencia de una correlación entre el logaritmo natural del porcentaje de retención de sorbato de potasio y el aumento de la absorbancia a 420 nm, se aplicó un test de hipótesis sobre el coeficiente de correlación en base al parámetro "t" para el 95 % de confianza (Steel y Torrie, 1960).

Todos las pruebas estadísticas utilizadas se describen en el apéndice de "Procedimientos Estadísticos".

Para la realización de las distintas pruebas se utilizó el programa Quattro Pro, Versión 2,0 (Borland International Inc., 1990) diseñándose planillas de cálculo para cada procedimiento en particular.

4.4 - RESULTADOS Y DISCUSION

4.4.1 - Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del ácido sórbico

Se analizó la retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento de todos los sistemas modelo estudiados con el objetivo de obtener una expresión cinética que permitiese cuantificar la degradación.

Teniendo en cuenta este objetivo resulta pertinente recordar el concepto de "velocidad de reacción".

Sea una reacción simple del tipo:

$$\sum_{j=1}^n \mu_j I_j = 0 \quad (4.4)$$

donde: μ_j es el coeficiente estequiométrico del reactante.
 I_j es la especie reactante.

Se define velocidad de reacción:

$$r = \frac{1}{\mu_j} \frac{dn_j}{V dt} \quad (4.5)$$

donde V es el volumen, n es el número de moles y t es el tiempo.

Es decir, la velocidad de reacción, r , es la variación del número de moles de un determinado componente I_j en la unidad de tiempo y de volumen. Definida de esta forma, r es siempre positiva y su valor es independiente del reactante j que se elija (Levenspiel, 1962).

Si el volumen es constante, la velocidad de reacción se puede expresar como:

$$r = \frac{1}{\mu_j} \frac{dc_j}{dt} \quad (4.6)$$

donde $c = n/V$ es la concentración de reactante al tiempo t (moles /l).

Si la reacción es:



Luego, la velocidad de reacción, r es:

$$r = \frac{1}{\mu_A} \frac{dc_A}{dt} = - \frac{dc_A}{dt} \quad (4.7)$$

donde: c_A = concentración de la especie A al tiempo t

En el caso particular de la degradación del ácido sórbico, los datos experimentales regresionaron significativamente indicando una cinética de primer orden, por lo tanto, la ecuación (4.7) se puede expresar como:

$$- dc_A/dt = k \cdot c_A \quad (4.8)$$

donde: k = constante de velocidad de la reacción (tiempo⁻¹)

Integrando dicha expresión resulta:

$$\ln c/c_0 = - k \cdot t \quad (4.9)$$

donde: c_0 es la concentración inicial de sorbato de potasio y
 c/c_0 es la retención de sorbato de potasio al tiempo t .

Los valores de k para algunos de los sistemas estudiados pueden observarse en la Tabla 4.6.

El comportamiento cinético mencionado está en concordancia con el reportado por otros autores (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1983; Seow y Cheah, 1985, a ; Gerschenson y col., 1986; Guerrero, 1990).

El efecto de la temperatura en la cinética de pérdida de nutrientes y preservadores ha sido ampliamente estudiado por Labuza y Riboh (1982) y, en general, se ha observado que la dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura se ajusta al modelo de Arrhenius:

$$k = k_0 \cdot e^{-E_a/RT} \quad (4.10)$$

donde: k_0 = factor de frecuencia (tiempo⁻¹)

E_a = energía de activación (Kcal/mol)

T = temperatura absoluta (K)

R = constante de los gases ideales ($1,987 \cdot 10^{-3}$ Kcal/mol K)

Tabla 4.6: Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato de potasio

Sistema	Temp. (° C)	Parámetro	
		$k \pm d$	$E_a \pm d$ (Kcal/mol)
1 (agua/KS) pH 5, 0	33	1, 3 ± 0, 1 a	7 +/- 1 ae
	45	1, 9 ± 0, 1 b	
	57	3, 2 ± 0, 1 cd	
3 (agua/KS/glicerol) pH 5, 0	33	1, 4 ± 0, 1 ar	13 +/- 2 abf
	45	3, 0 ± 0, 2 bs	
	57	6, 8 ± 0, 4 cet	
4 (agua/KS/NaCl/glicerol) pH 5, 0	57	1, 4 ± 0, 1 deu	
7 (agua/KS/glicerol) pH 6, 0	57	&11, 1 ± 0, 5	
9 (agua/KS/NaCl/gly) pH 5, 0	33	6, 3 ± 0, 3 fi	8 +/- 1 f
	45	11, 5 ± 0, 2 gj	
	57	16, 9 ± 0, 3 h	
10 (agua/KS/glicerol/gly) pH 5, 0	33	13, 6 +/- 0, 3 fr	7 +/- 1 bd
	45	21, 1 ± 0, 3 gms	
	57	30, 4 ± 1, 3 hnt	
11 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 5, 0	33	3, 5 ± 0, 1 ilo	10 +/- 1 cde
	45	7, 2 ± 0, 2 jmp	
	57	13, 4 ± 0, 4 nquv	
	70	18, 8 ± 1, 5	
	80	35, 1 ± 1, 5	
	90	53, 8 ± 2, 0	
12 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 6, 0	33	1, 8 ± 0, 1 o	16 +/- 1 c
	45	4, 9 ± 0, 1 p	
	57	11, 3 ± 0, 5 q	
11 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 5, 0 #	57	26, 8 ± 2, 0 r	
12 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 5, 0 *	57	6, 3 ± 0, 8 r	

KS: sorbato de potasio; gly: glicina.

d : desviación estándar.

& Presenta un periodo de inducción de 67 días

Las constantes de velocidad (k) o las energías de activación (Ea) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0, 95)

Las constantes de velocidad (k) varían significativamente con la temperatura para cada sistema; por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0, 91, con excepción del sistema 1 cuya actividad de agua es 1, 00.

almacenado en frascos de polietileno de alta densidad.

En todos los sistemas estudiados en los cuales se registraron pérdidas de sorbato de potasio a lo largo del almacenamiento, se halló que la ecuación de Arrhenius ajusta significativamente la dependencia de las constantes de velocidad de reacción con la temperatura. Las energías de activación obtenidas se encuentran en el rango comprendido entre 7 y 16 kcal/mol.

4.4.2 - Parámetros cinéticos de las reacciones de pardeamiento inducidas por los sorbatos y/o por sus productos de degradación

Se analizó el aumento de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo de almacenamiento de los sistemas modelo estudiados. En todos los casos se encontró que la misma varía en forma lineal con el tiempo, por lo tanto, se postuló que la reacción ajusta significativamente a una cinética de orden cero:

$$d\text{Abs}_{420} / dt = k_A \quad (4.11)$$

donde: Abs_{420} = absorbancia a 420 nm

t = tiempo

k_A = constante de velocidad de la reacción
(unidades de absorbancia/tiempo)

Los resultados correspondientes pueden apreciarse en la Tabla 4.7.

Este comportamiento cinético es coincidente con el reportado por otros autores que han estudiado las reacciones de pardeamiento no enzimático inducidas por los productos de degradación del sorbato (Seow y Cheah, 1985, b; Obanu y Ledward, 1986; Thakur y Arya, 1991) o por otras sustancias (Mizrahi y col., 1970; Warmbier y col., 1976; Labuza y Stalmarch, 1980; Stamp y Labuza, 1983).

En algunos sistemas, se observó la existencia de un período de inducción después del cual, la cinética ajustó al orden mencionado.

La dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura ajusta significativamente el modelo de Arrhenius y las energías de activación se encuentran en el rango comprendido entre 7 y 27 kcal/mol.

4.4.3 - Influencia de la temperatura sobre la estabilidad

En los sistemas en que se deprimió la actividad de agua por adición de NaCl a pH 5,0 y 6,0 (sistemas 2 y 6) ó con NaCl y glicerol a pH 6,0 (sistema 8) ó con NaCl, KCl y glicerol a pH 5,0 (sistema 5), no se detectaron pérdidas de sorbato de potasio, ni un incremento de la absorbancia a 420 nm aún al cabo de 140-180 días de almacenamiento a 33, 45 y 57 °C. Ello se observa en las Figuras 4.3 y 4.4.

Tabla 4.7: Parámetros cinéticos de la reacción de pardeamiento no enzimático.

Sistema	Temp. (° C)	Parámetro		
		k (\pm d) $\times 10^3$ (abs/día)	Período de inducción	$E_a \pm d$ (Kcal/mol)
1 (agua/KS) pH 5, 0	33	0, 4 \pm 0, 1		ab
	45	1, 4 \pm 0, 1		21 +/- 2
	57	4, 1 \pm 0, 1 ab		
3 (agua/KS/glicerol) pH 5, 0	33	0, 4 \pm 0, 1	63	chi
	45	1, 6 \pm 0, 1	34	27 +/- 3
	57	9, 3 \pm 0, 1 acd	18	
4 (agua/KS/NaCl/glicerol) pH 5, 0	57	0, 6 \pm 0, 1 bc		
7 (agua/KS/glicerol) pH 6, 0	57	2, 2 \pm 0, 2 d	67	
9 (agua/KS/NaCl/gly) pH 5, 0	33	8, 0 \pm 0, 1 g		adgh
	45	12, 0 \pm 0, 5 eh		7 +/- 1
	57	17, 8 \pm 0, 2 fi		
10 (agua/KS/glicerol/gly) pH 5, 0	33	9, 3 \pm 0, 4 j		bceg
	45	24, 2 \pm 0, 5 ekr		12 +/- 1
	57	38, 5 \pm 1, 4 fls		
11 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 5, 0	33	4, 0 \pm 0, 1 gjm		defi
	45	10, 7 \pm 0, 4 hkmp		18 +/- 1
	57	21, 4 \pm 1, 0 iloqt		
	70	82, 6 \pm 3, 6		
	90	204, 6 \pm 7, 5		
12 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 6, 0	33	1, 5 \pm 0, 1 m		f
	45	5, 7 \pm 0, 2 n		23 +/- 1
	57	24, 1 \pm 0, 9 o		
11 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 5, 0 #	57	33, 5 \pm 3, 0 t		
13 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) pH 5, 0 *	57	7, 2 \pm 0, 2 t		
43 (agua/glicerol/gly) pH 5, 0	45	0, 7 \pm 0, 1 r		
	57	2, 7 \pm 0, 1 s		
44 (agua/glicerol/NaCl/gly) pH 5, 0	45	0, 7 \pm 0, 1 p		
	57	3, 4 \pm 0, 3 q		

KS: sorbato de potasio; gly: glicina.

d : desviación estándar.

& Presenta un periodo de inducción.

Las constantes de velocidad (k) o las energías de activación (E_a) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0, 05)

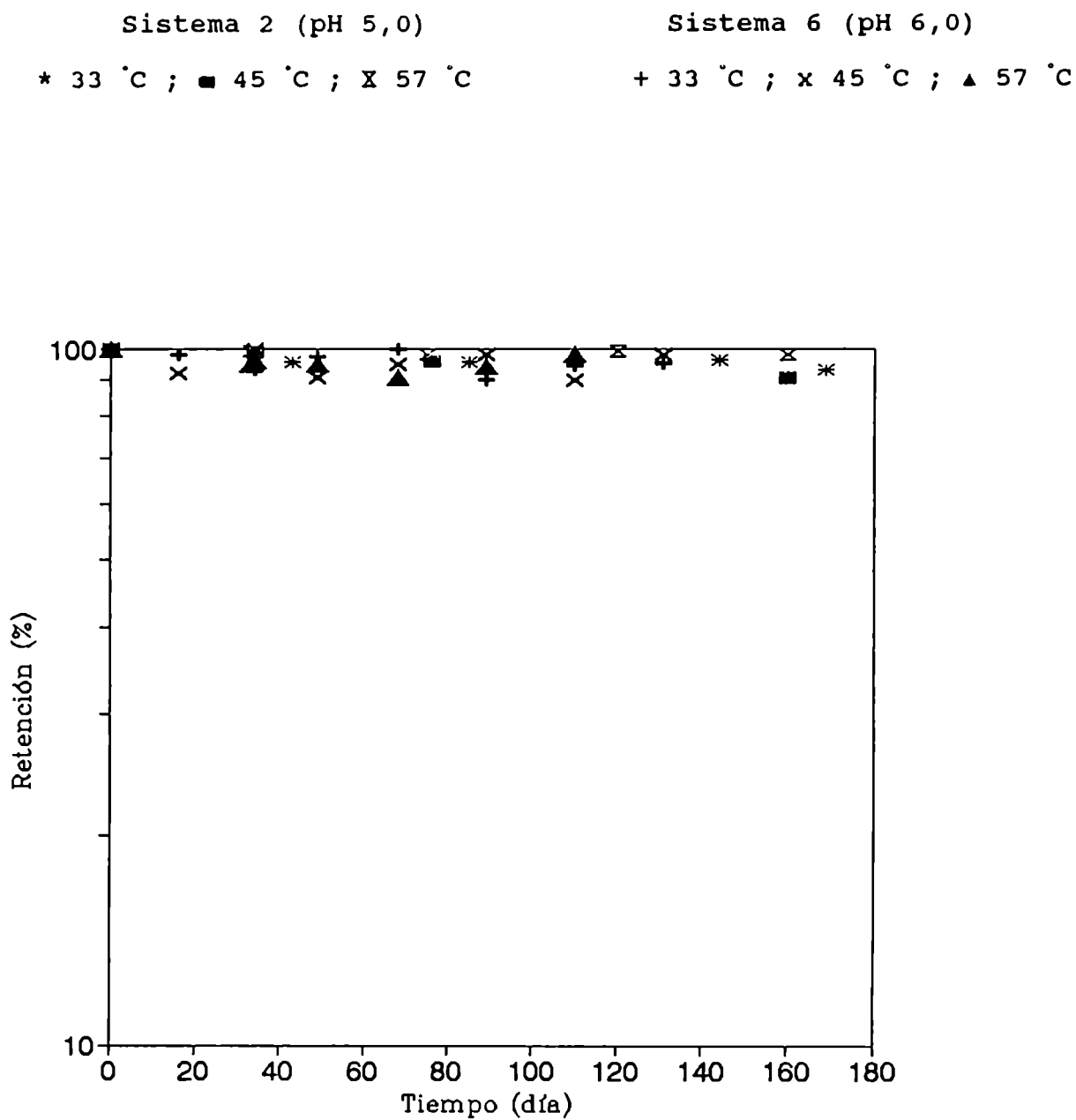
Las constantes de velocidad (k) varían significativamente con la temperatura para cada sistema; por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0, 91, con excepción del sistema 1 cuya actividad de agua es 1, 00.

almacenado en frascos de polietileno de alta densidad.

*: acidificado con ácido cítrico.

Figura 4.3: Retención de sorbato de potasio en presencia de soluciones acuosas de NaCl de a_w 0,91.



En la Figura 4.5 se observa que en aquellos sistemas en que se deprimió la actividad de agua por agregado de glicerol a pH 6,0 (sistema 7) o por agregado de NaCl y glicerol a pH 5,0 (sistema 4) sólo se detectaron pérdidas a 57 °C. Coincidentemente, en estos sistemas, se observó un incremento en la absorbancia a 420 nm, únicamente a 57 °C.

Estos resultados indican que en estos sistemas existiría una correlación entre la degradación de los sorbatos y el desarrollo de pardeamiento. Con el objetivo de determinar la incidencia de dicha degradación en el pardeamiento de los sistemas analizados, se estudió el pardeamiento en ausencia de sorbato. Se observó que en ausencia de dicho preservador, el glicerol en las condiciones experimentales usadas presentaba un pardeamiento nulo y la mezcla de glicerol y glicina, una velocidad de pardeamiento muchísimo menor que la registrada en presencia de sorbato. Estas experiencias que serán analizadas detalladamente en las páginas 167 y 186 muestran la importante contribución de la degradación de los sorbatos al desarrollo de pardeamiento.

Para los restantes sistemas estudiados, la retención de sorbato de potasio disminuyó al aumentar el tiempo o la temperatura. Como se mencionó previamente, la reacción de degradación ajusta a una cinética de primer orden. Sin embargo, se debe destacar que, en algunos casos, la destrucción del sorbato a lo largo del tiempo de estudio fue menor al 50 %. Si bien este hecho aumenta la incertidumbre en el cálculo del orden de reacción (Labuza y Riboh, 1982), no se efectuaron almacenamientos mayores a 180 días ya que dicho lapso supera el tiempo de vida de estantería de muchos alimentos de alta humedad.

En aquellos sistemas en los que se registraron pérdidas en el contenido de sorbato, la absorbancia a 420 nm aumentó con el incremento de la temperatura o el tiempo de almacenamiento. Como ya se mencionó, la velocidad de pardeamiento no enzimático ajusta a una cinética de orden cero. Ello se aprecia, a modo de ejemplo, en la Figura 4.6, la cual corresponde al sistema control (sistema 1).

En las Tablas 4.6 y 4.7 se detallan algunos de los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la reacción de destrucción del sorbato y para las reacciones de pardeamiento no enzimático.

Con el objetivo de evaluar las pérdidas de sorbato y la formación de pigmentos pardos a temperaturas de procesamiento y para establecer si se producían cambios en la sensibilidad de dichas reacciones frente al cambio de temperatura, el sistema formado por agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina a pH 5,0 (sistema 11) fue almacenado también a 70, 80 y 90 °C. El análisis estadístico de los datos indicó que no existen diferencias significativas entre la energía de activación hallada para el rango de 33, 45 y 57 °C y para el de 70, 80 y 90 °C (Tablas 4.6 y 4.7).

Figura 4.5: Retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento.

(a) En presencia de glicerol a pH 6,0 (sistema 7)

(b) En presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0 (sistema 4)

* 33 °C ; + 45 °C ; ▲ 57 °C

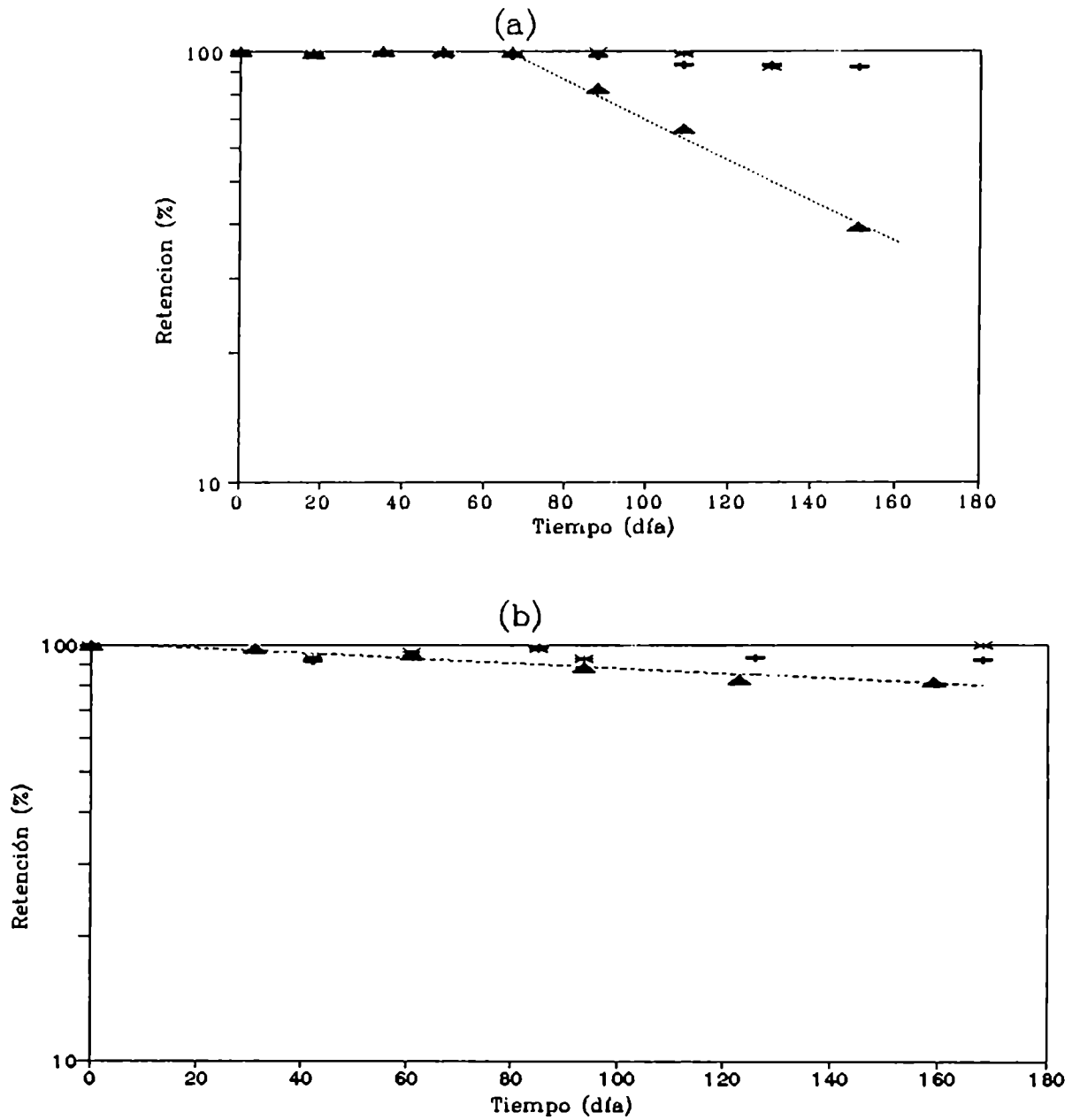
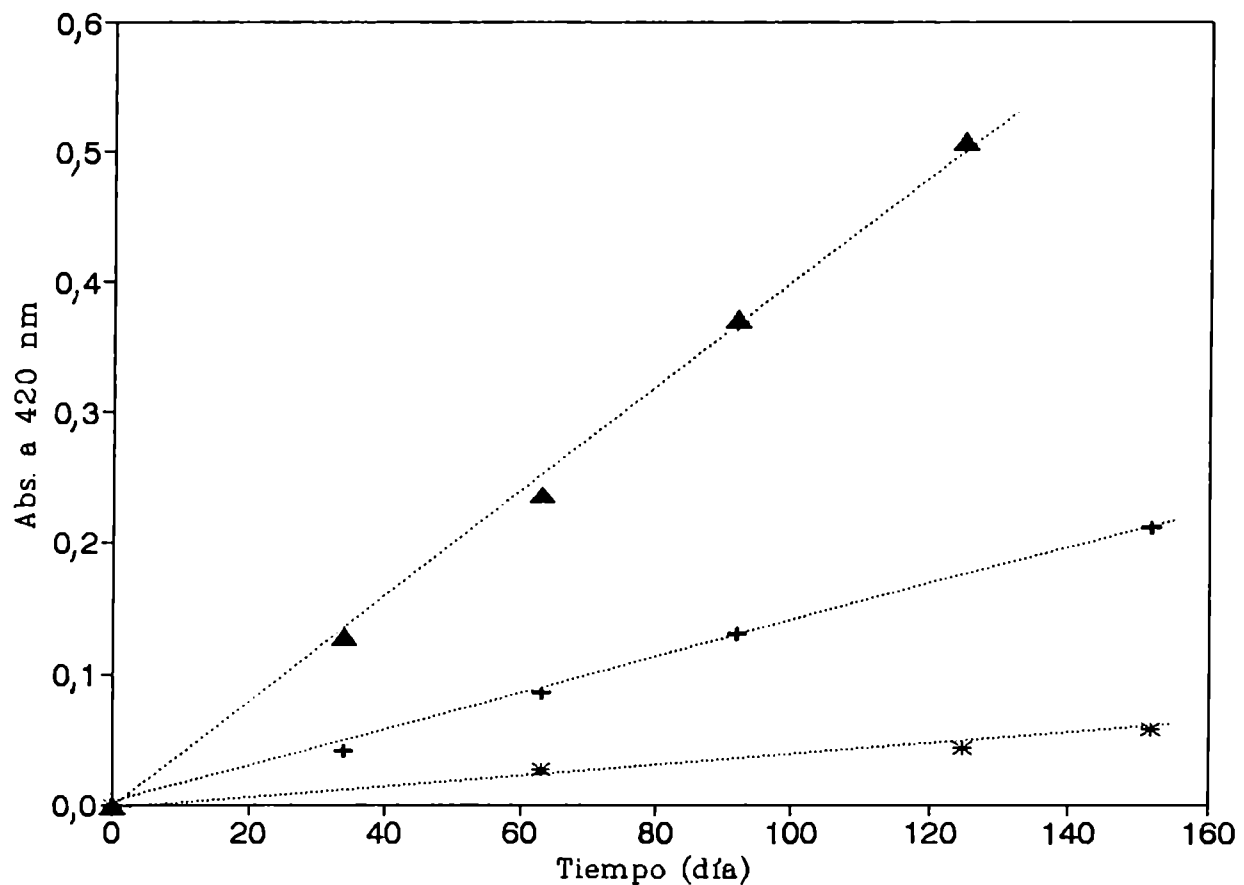


Figura 4.6: Absorbancia a 420 nm en función del tiempo de almacenamiento para una solución acuosa de sorbato de potasio (sistema 1).

* 33 °C ; + 45 °C ; ▲ 57 °C



En la Tabla 4.7 se puede observar que los sistemas que contienen glicerol como humectante (sistemas 3 y 7) presentaron un período de inducción para el pardeamiento no enzimático. A pH 5,0 (sistema 3), la extensión de dicho período disminuyó con el incremento de temperatura. A pH 6,0 (sistema 7), la finalización del período de inducción, a los 67 días, fue coincidente con el inicio de las pérdidas en el contenido de sorbato en dicho sistema.

Seow y Cheah (1985, b) estudiaron el pardeamiento no enzimático del ácido sórbico y del glicerol en sistemas modelo y también observaron la existencia de un período de inducción en soluciones acuosas de pH 4,0, almacenadas a 40 °C. Este período desaparecía al aumentar la temperatura a 50 °C.

Thakur y Arya (1991) reportaron la existencia de un período de inducción, en sistemas modelo acuosos conteniendo sorbato de potasio, glicerol y glucosa después del cual, la cinética de pardeamiento ajustaba al orden mencionado.

En otros trabajos en los que se estudió el pardeamiento no enzimático de sistemas formados por glucosa y glicina también se encontró un período inicial de inducción (Song y col., 1966; Warmbier y col., 1976).

Como se muestra en la Figura 4.6, el sorbato de potasio "per se" se pardeó a lo largo del almacenamiento. Arya y Thakur (1988) estudiaron los cambios en la concentración de los grupos carbonilo, formados durante la degradación del ácido sórbico y encontraron que la formación de compuestos pardos se debía mayoritariamente a la polimerización de la β -carboxiacroleína.

En general, las energías de activación obtenidas para la reacción de destrucción del sorbato fueron significativamente menores que las de la reacción de pardeamiento. Esto indicaría que la reacción de destrucción del sorbato presenta una menor sensibilidad frente al cambio de temperatura que las reacciones de pardeamiento concomitantes. En las Figuras 4.7, 4.8 y 4.9 se muestra el efecto de la temperatura sobre la velocidad de ambas reacciones. Allí se puede observar que, conforme se elevó la temperatura, cobró mayor importancia la formación de pigmentos pardos. Es así que a partir de una dada temperatura, T_c , predominó la reacción de pardeamiento. La misma fue de 33 °C en el sistema conteniendo glicina y con NaCl y glicerol como humectantes (Fig. 4.9 a). Fue de 46 °C cuando se usó glicerina como humectante (Fig. 4.8 b) y de 57 °C, en presencia de NaCl (Fig. 4.8 a).

Figura 4.7: Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad de las reacciones de destrucción de los sorbatos y del pardeamiento no enzimático.

(a) Sistema 1 (agua, sorbato de potasio; pH 5,0)

(b) Sistema 3 (agua, sorbato de potasio y glicerol; pH 5,0)

* degradación de sorbato de potasio
 x pardeamiento no enzimático

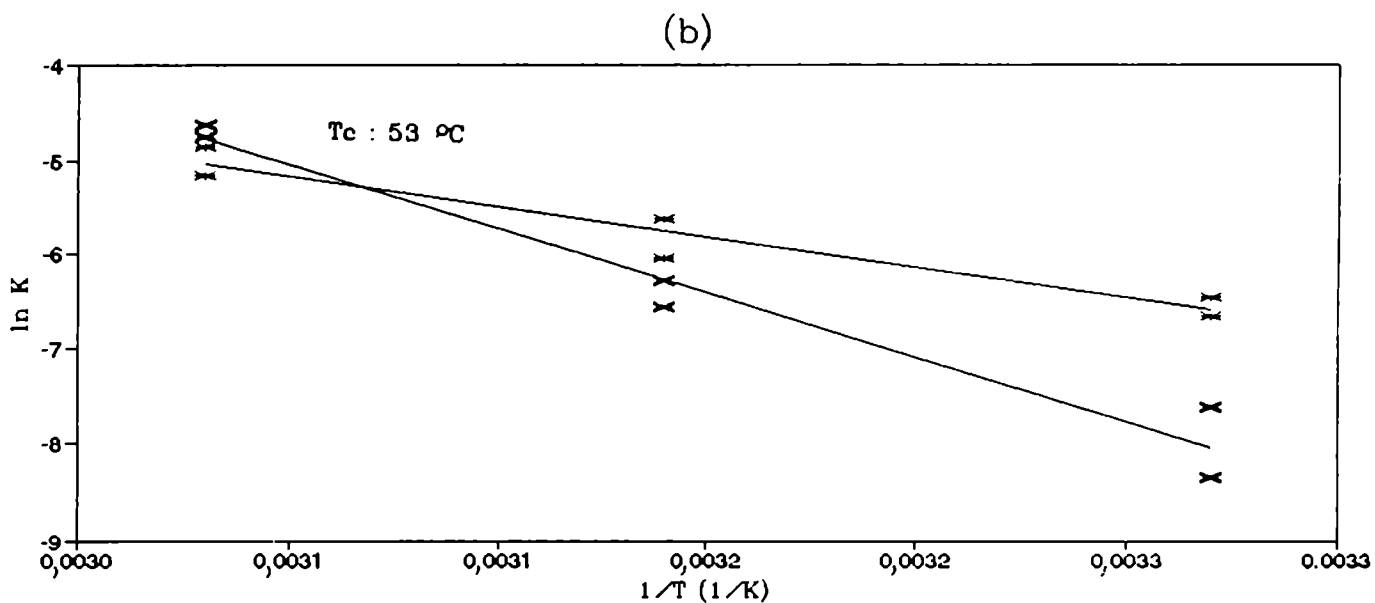
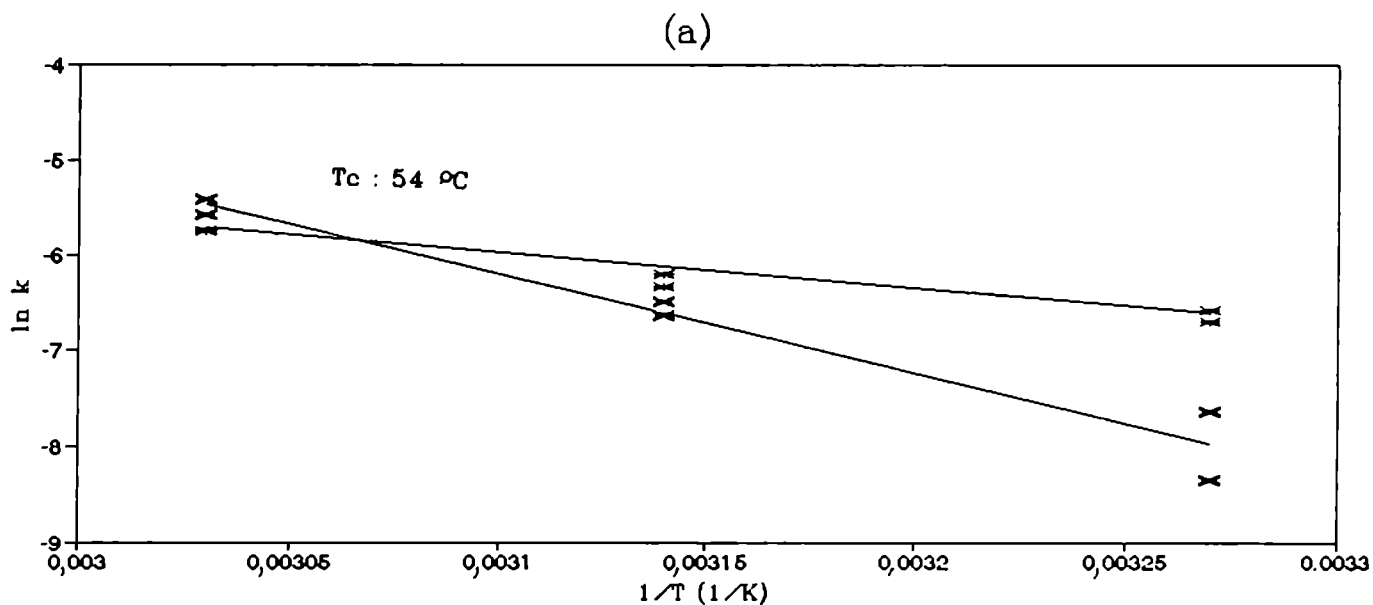


Figura 4.8: Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad de las reacciones de destrucción de los sorbatos y del pardeamiento no enzimático.

(a) Sistema 9 (agua, sorbato de potasio, NaCl y glicina; pH 5,0)

(b) Sistema 10 (agua, sorbato de potasio, glicerol y glicina; pH 5,0)

* degradación de sorbato de potasio
 x pardeamiento no enzimático

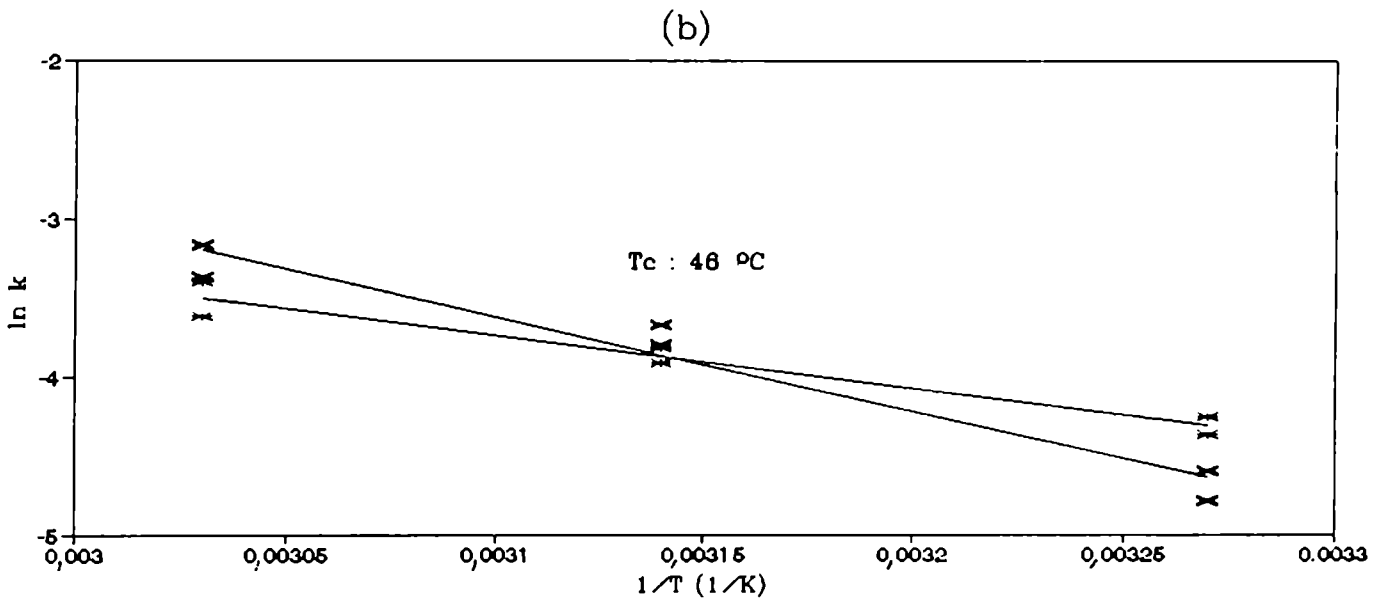
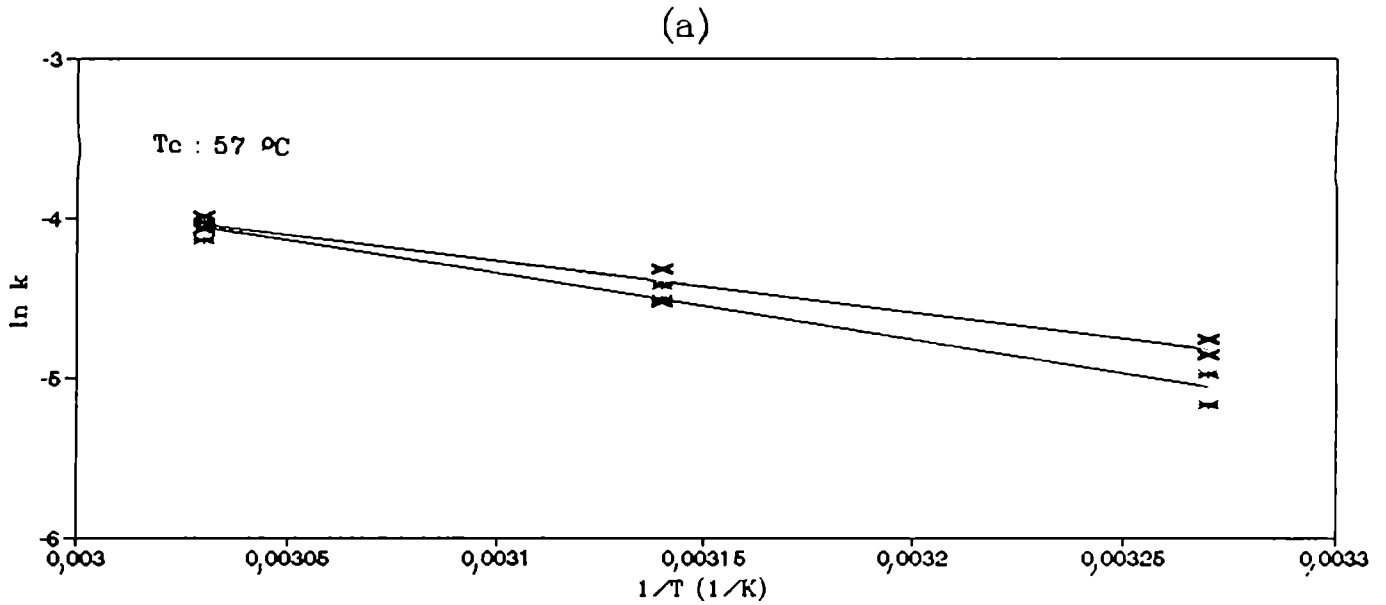


Figura 4.9: Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad de las reacciones de destrucción de los sorbatos y del pardeamiento no enzimático.

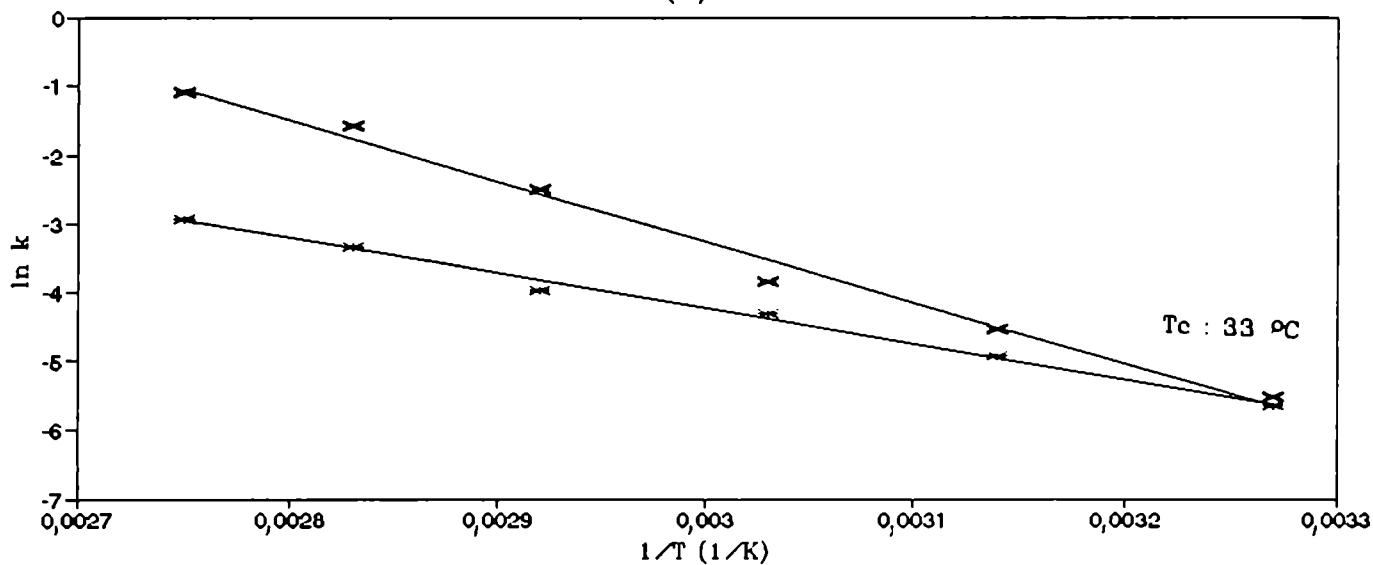
(a) Sistema 11 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina; pH 5,0)

(b) Sistema 12 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina; pH 6,0)

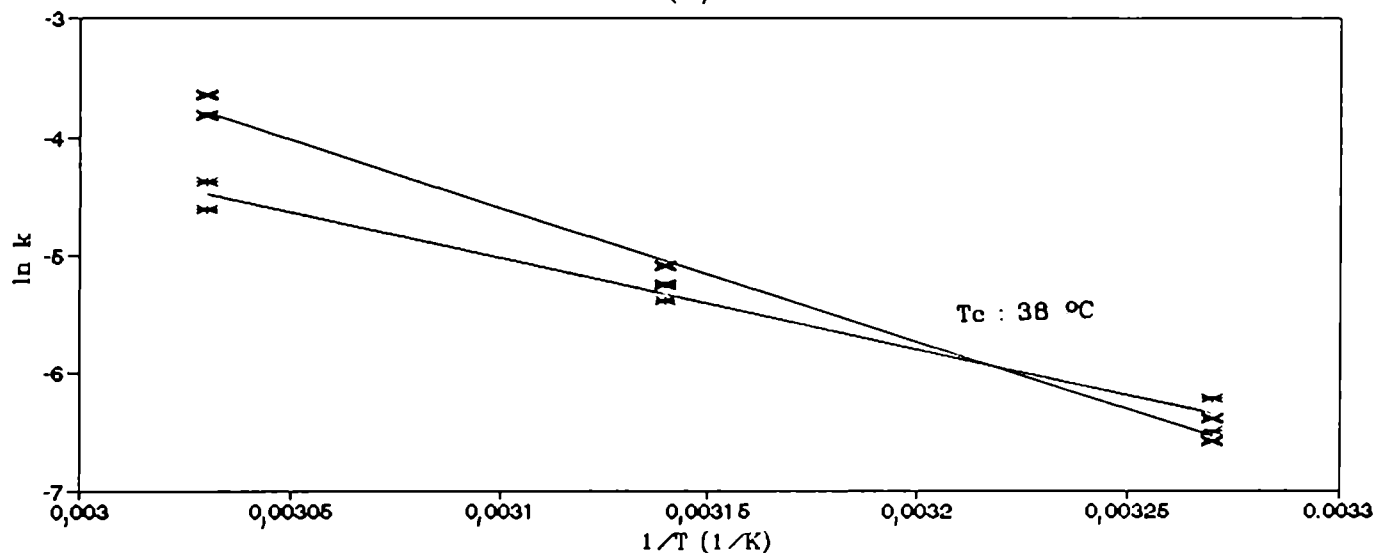
* degradación de sorbato de potasio

x pardeamiento no enzimático

(a)



(b)



4.4.4 - Influencia del pH

4.4.4.1 - Degradación del sorbato

El incremento en el pH de 5,0 a 6,0 produjo una disminución significativa en la velocidad de reacción. El efecto protector fue tal que cuando se empleó glicerol como humectante a pH 6,0, no se detectaron pérdidas en el contenido de sorbato a lo largo de la experiencia a 33 y 45 °C e inclusive, a 57 °C, se observó un período de inducción de 67 días, a partir del cual recién el preservador comenzó a degradarse. Ello se muestra en la Figura 4.5 a. Cabe mencionar que a pesar de que la constante de velocidad de la reacción a pH 6,0 fue mayor que la de pH 5,0 (Tabla 4.6, sistemas 3 y 7), las pérdidas de sorbato a lo largo del almacenamiento fueron menores a pH 6,0 debido a la presencia del período de inducción en este sistema.

En presencia de presencia de NaCl, glicerol y glicina, a todas las temperaturas estudiadas, se observó el efecto protector del pH (Fig. 4.10 a y b; sistemas 11 y 12). Estos resultados están en concordancia con los reportados por otros investigadores (Arya, 1980; Vidayasagar y Arya, 1983; Gerschenson y col., 1986 y 1987; Guerrero y col., 1990).

Según Arya (1980), el efecto protector del aumento de pH se debe al hecho de que la tendencia a la autooxidación de la fracción no disociada del ácido es alta, mientras que la fracción disociada, prácticamente no se degrada.

Como se observa en la Tabla 4.8, la proporción del ácido no disociado respecto del total depende del rango de pH y, por lo tanto, la eficiencia del efecto protector también depende de esta variable. En el caso de elevar el pH de 5,0 a 6,0, la variación del porcentaje es importante, lo cual explicaría la tendencia observada.

Tabla 4.8: Efecto del pH sobre el porcentaje de ácido no disociado respecto al contenido total de sórbico.

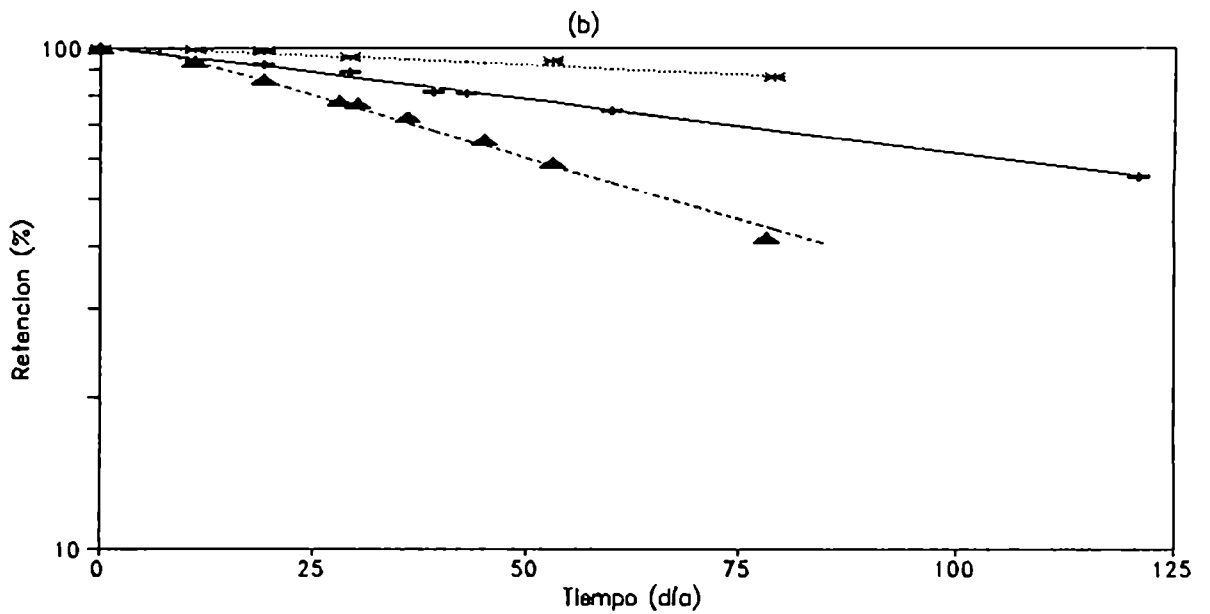
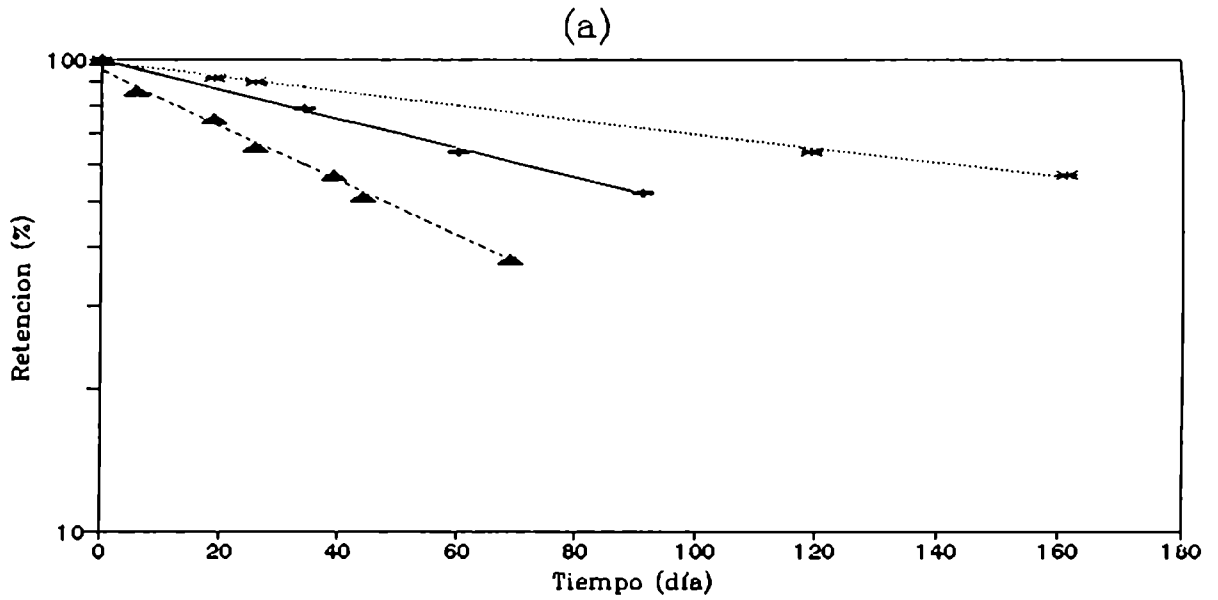
pH	porcentaje de ácido no disociado/total
2,0	99,79
3,0	97,91
4,0	82,39
5,0	31,87
6,0	4,47
7,0	0,47

Figura 4.10: Degradación del sorbato de potasio en presencia de NaCl, glicerol y glicina.

(a) pH 5,0 (sistema 11)

(b) pH 6,0 (sistema 12)

* 33 °C ; + 45 °C ; ▲ 57 °C



En el caso de los sistemas 11 y 12, se observó que el aumento de pH provoca un incremento en la energía de activación y en consecuencia, una mayor sensibilidad frente al cambio de temperatura, cuando el pH es 6,0. Guerrero y col. (1990) también observaron este efecto al estudiar la degradación de los sorbatos en sistemas modelo acuosos constituidos por sorbato de potasio al 0,2 % (m/m) y NaCl al 8,0 % (m/m), acidificados mediante la adición de ácido cítrico a pH 5,0 o 6,0 y envasados en envases de polipropileno.

En la Tabla 4.9 se observa la disminución de las constantes cinéticas y el aumento de la energía de activación con el incremento de pH para el sistema precitado. Asimismo, se reportan los datos obtenidos por Guerrero y col. (1990) al estudiar la degradación del sorbato en un sistema conteniendo un 8,0 % de NaCl ($a_w = 0,95$), los cuales muestran una tendencia semejante a la de los datos de este trabajo.

Gerschenson y col. (1986), en un trabajo en el que se analizó la estabilidad del ácido sórbico en soluciones azucaradas constituidas por sorbato de potasio al 0,10 % y glucosa en cantidad suficiente para deprimir la actividad de agua a 0,94 cuyo pH se ajustó a 3,5 y 4,5 por agregado de ácido cítrico, no observaron cambios en la energía de activación con el pH. Sin embargo, cuando adicionaron lisina (1,72 % m/m), el cambio de pH de 3,5 a 4,5 produjo un incremento en la energía de activación de 17 ± 3 kcal/mol a 32 ± 5 kcal/mol.

Los resultados comentados indicarían que la tendencia al incremento de la energía de activación con el pH depende de la composición del sistema. No obstante, cuando ésta se verifica, el efecto protector del aumento de pH se vería relativizado por la mayor sensibilidad frente al cambio de temperatura a valores de pH más altos. Además, debe recordarse que al incrementarse el pH se disminuye la acción antimicrobiana del preservador.

4.4.4.2 - Pardeamiento no enzimático

En las Figuras 4.11 y 4.12 se muestra el efecto del incremento de pH sobre la velocidad de pardeamiento en sistemas conteniendo glicerol (sistemas 3 y 7) y NaCl, glicerol y glicina (sistemas 11 y 12). Puede observarse que, en general, el incremento de pH de 5,0 a 6,0 produjo una disminución en la velocidad de pardeamiento. En el caso del sistema 7 (Figura 4.11) también se observó un aumento del período de inducción.

Tabla 4.9: Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción de los sorbatos.

Sistema	Temp. (° C)	Constante de destrucción		Porcentaje de disminución de la constante de destrucción
		3^{-1} (k ± d). 10 (día)	3^{-1} (k ± d). 10 (día)	
11 (agua/KS/NaCl/glicerol/gly) aw 0,91	33	3,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	49
	45	7,2 ± 0,2	4,9 ± 0,1	32
	57	13,4 ± 0,4	11,3 ± 0,5	16
pH		5,0	6,0	
Energía de activación		10 ± 1	16 ± 1	

KS: sorbato de potasio; gly: glicina.

Sistema	Temp. (° C)	Constante de destrucción		Porcentaje de disminución de la constante de destrucción
		3^{-1} (k ± d). 10 (día)	3^{-1} (k ± d). 10 (día)	
agua/KS/NaCl/glicerol aw 0,91 *	24	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	52
	33	2,3 ± 0,1	1,5 ± 0,2	34
	45	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2	15
pH		5,0	6,0	
Energía de activación		8 ± 2	12 ± 4	

* Datos extraídos de Guerrero y col (1990).

Figura 4.11: Efecto del pH sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático en presencia de glicerol a 57 °C

▲ pH 5,0 ; ■ pH 6,0

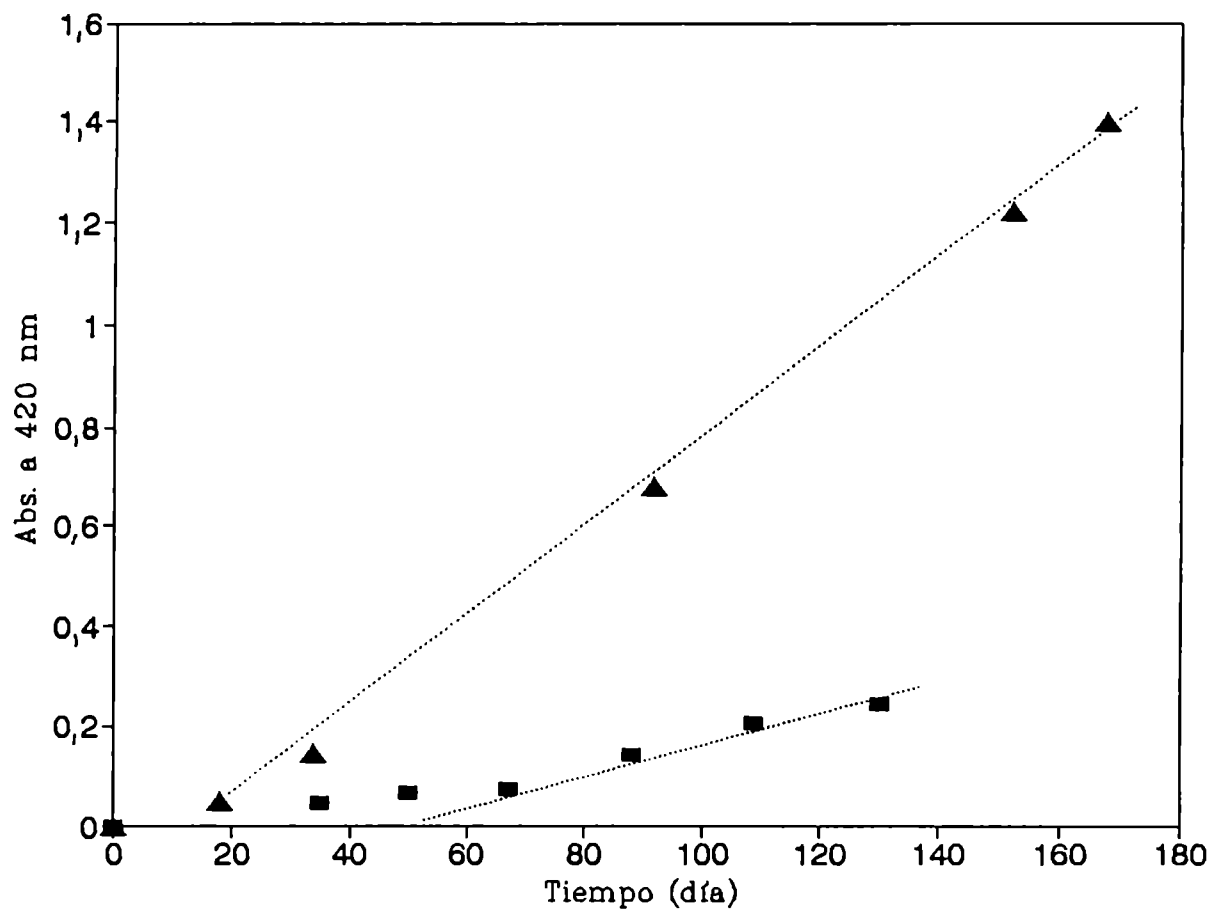
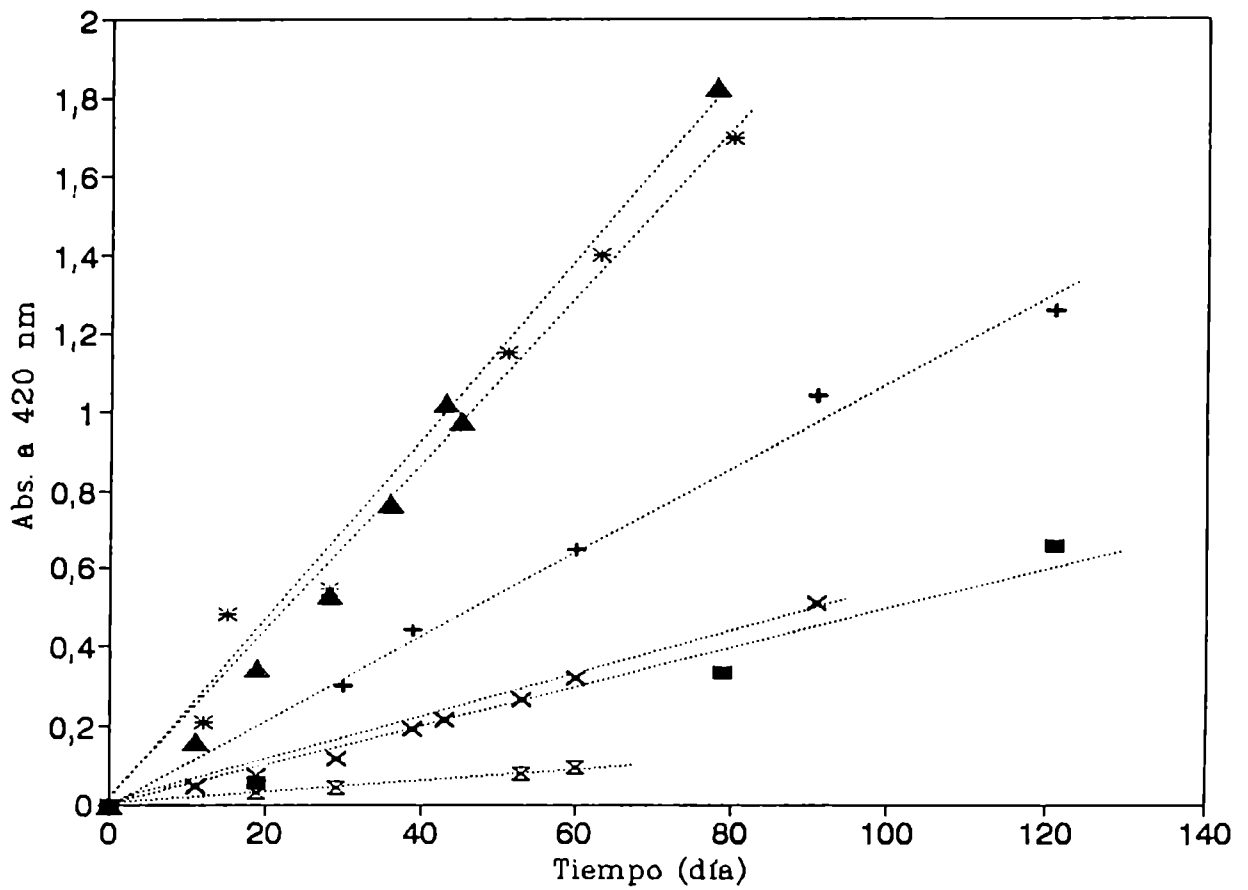


Figura 4.12: Efecto del pH sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático en presencia de NaCl, glicerol y glicina.

■ pH 5,0 a 33 °C ; + pH 5,0 a 45 °C ; * pH 5,0 a 57 °C
x pH 6,0 a 57 °C ; x pH 6,0 a 45 °C ; ▲ pH 6,0 a 57 °C



En las reacciones de pardeamiento no enzimático, un incremento en el pH de 5,0 a 6,0 aumentó la velocidad de formación de pigmentos pardos (Buera, 1986). Sin embargo, en este trabajo se observó, en general, el efecto opuesto. Esta aparente contradicción estaría relacionada con el efecto protector del aumento de pH sobre la degradación del sorbato. Como se analizó en el párrafo anterior, la velocidad de destrucción del sorbato en los sistemas 7 y 12 (pH 6,0) fue mucho menor que en los sistemas 3 y 11 (pH 5,0). En consecuencia, se formaría una menor cantidad de compuestos carbonílicos, los cuales constituyen uno de los sustratos para la formación de compuestos pardos.

La Figura 4.13 muestra el tiempo y el porcentaje de destrucción necesario para que el sistema constituido por: agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina alcance una absorbancia de 0,1 a 420 nm, la cual corresponde a la aparición de un color amarillento que evidencia un deterioro organoléptico. En esta figura se aprecia que, a todas las temperaturas estudiadas, una degradación no mayor al 10% fue suficiente para el deterioro mencionado. Además, el tiempo necesario para el deterioro del color se incrementó notoriamente cuando el pH se elevó de 5,0 a 6,0 pues, como ya se mencionó, las constantes de velocidad de la reacción de pardeamiento no enzimático fueron menores cuanto más básico fue el pH. Por ejemplo, a 33°C fueron necesarios 25 días de almacenamiento a pH 5,0, mientras que a pH 6,0 el tiempo se elevó a 65 días. Este incremento disminuyó de magnitud conforme se elevó la temperatura debido a que el aumento de pH provocó un incremento en la energía de activación. Por ello, a pH 6,0, el incremento de las constantes de velocidad de pardeamiento no enzimático al elevar la temperatura de 33 °C a 57 °C fue mayor que el incremento en dichas constantes a pH 5,0.

Petriella (1986) al estudiar el pardeamiento no enzimático de sistemas modelo glucosa-lisina cuya actividad de agua fue ajustada a 0,900, 0,925 y 0,950 con glicerol y almacenados a 45, 55 y 65 °C, también encontró que la energía de activación aumentaba cuando el pH se incrementaba en el rango comprendido entre 4 y 6.

4.4.4 - Influencia del ácido usado para ajustar el pH

4.4.5.1 - Degradación del sorbato

En la Figura 4.14 se aprecia el efecto protector del ácido cítrico en relación al fosfórico sobre el decaimiento del sorbato en el sistema formado por agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina a pH 5,0 (Tabla 4.6, sistemas 11 y 13).

Figura 4.13: Efecto del pH y de la temperatura sobre el tiempo y el porcentaje de destrucción de sorbato de potasio necesarios para alcanzar una absorbancia de 0,1 a 420 nm en presencia de NaCl, glicerol y glicina.

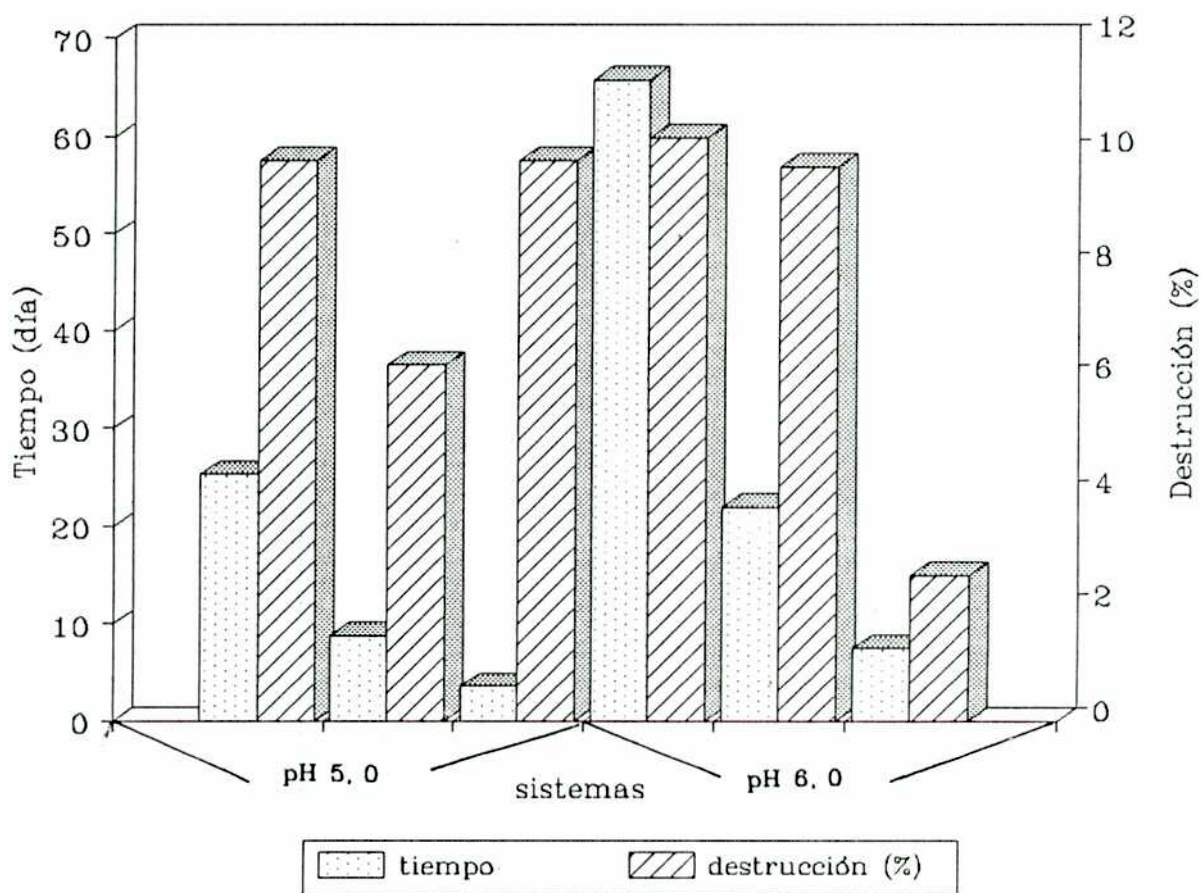
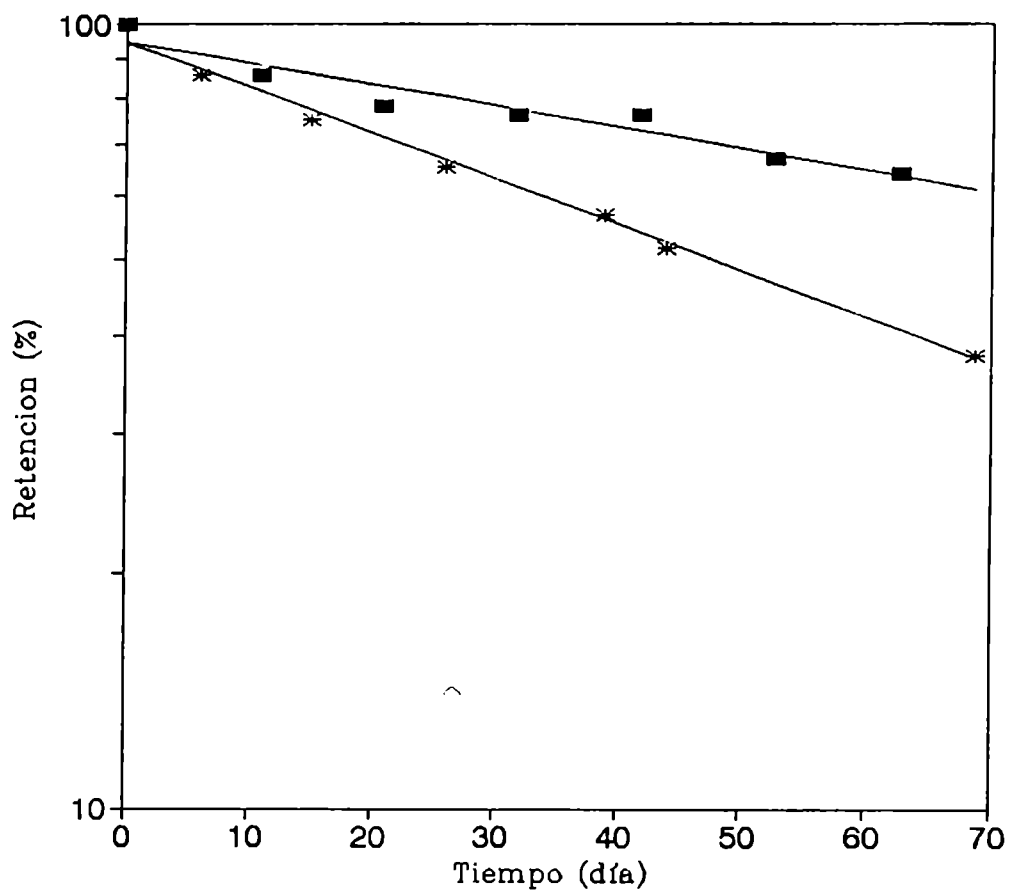


Figura 4.14: Efecto del acidificante en la retención de sorbato de potasio a 57 °C, en soluciones acuosas de pH 5,0 conteniendo NaCl, glicerol y glicina.

■ cítrico ; * fosfórico



En la Tabla 4.10, se comparan valores de las constantes de velocidad obtenidas en este trabajo, empleando ácido fosfórico para ajustar el pH a 5,0 con datos obtenidos por Gerschenson y col. (1987) en sistemas de pH y composición similar, pero acidificados con ácido cítrico y envasados en polipropileno. Los valores de las constantes de velocidad obtenidas con ambos ácidos no presentaron diferencias significativas. Pero si se tiene en cuenta que el polipropileno favorece la destrucción de los sorbatos (Vidayasagar y Arya, 1984), se puede concluir que el ácido cítrico, en relación al fosfórico, ejerció un efecto protector sobre la degradación del sorbato.

Tabla 4.10: Efecto del acidificante sobre la degradación del sorbato de potasio.

Sistema	Acidificante usado	Temperatura (°C)	$(k \pm d) \cdot 10^3 \text{ (día}^{-1}\text{)}$
agua/KS	ortofosfórico	45	$1,9 \pm 0,1$
agua/KS*	cítrico	45	$1,8 \pm 0,4$
agua/KS/glicerol	ortofosfórico	45	$3,0 \pm 0,2$
agua/KS/glicerol*	cítrico	45	$3,2 \pm 0,3$

KS : sorbato de potasio.

d : desviación estándar.

* datos extraídos de Gerschenson y col. (1987).

Tanto el ácido cítrico como el fosfórico son ampliamente usados para evitar reacciones de oxidación en grasas y aceites debido a su capacidad para complejar trazas de iones metálicos como hierro y cobre (Mahoney y Graf, 1986). Dado que el catión hierro está presente como contaminante en la mayor parte de las sales y reactivos orgánicos, se analizó el contenido de Fe^{3+} presente en los sistemas estudiados y la capacidad de complejación del mismo por ambos ácidos con el propósito de clarificar la diferente incidencia de ambos. Los resultados obtenidos de contenido de hierro se muestran en la Tabla 4.11. En la misma pueden observarse concentraciones entre 0,021 y 0,050 ppm de Fe^{3+} y un aporte de hierro mayor por parte del fosfórico.

Tabla 4.11: Contenido de hierro (III) en los sistemas estudiados.

Sistema	ppm de Fe ³⁺
agua/KS/NaCl/glicerina/gly acidificado con fosfórico	0,080
agua/KS/NaCl/glicerina/gly acidificado con cítrico	0,053
agua/fosfórico*	0,048
agua/cítrico*	0,021

* en ambos casos, se adicionó al agua la cantidad de ácido necesaria para ajustar el pH del sistema estudiado a 5,0.

En base a los datos tabulados de las constantes de formación de los complejos (Burriel Martí y col., 1985), se calcularon las constantes de formación corregidas por el pH del medio y por la presencia de otros complejantes, en este caso el agua (Burriel Martí y col., 1985). Para ello se procedió de la siguiente forma:

* Cálculo de la constante de formación global condicionada a pH 5,0 para el anión citrato en medio acuoso.

$$K_r = K_{\eta} \cdot K_{\eta} \cdot K_{\beta} \cdot \alpha_3 \cdot (\alpha_{Fe})^2 \quad (4.12)$$

donde: K_r = constante de formación global condicionada por el pH y por la presencia de agua.

K_{η} = constante de formación del complejo $Fe^{3+}/Cit.^{3-}$

K_{η} = constante de formación del complejo $Fe^{3+}/Cit.H^2$

K_{β} = constante de formación del complejo $Fe^{3+}/Cit.H_2$

$\alpha = \frac{\text{concentración libre de un dado ion en el equilibrio}}{\text{concentración de todas las especies iónicas no complejadas en el equilibrio}}$

$\alpha_3 = [Cit.^{3-}]/C'_A$, $\alpha_2 = [Cit.H^2]/C'_A$, $\alpha_1 = [Cit.H_2]/C'_A$

C'_A = concentración total de citrato que no está complejada con el hierro.

$\alpha_{Fe} = [Fe^{3+}]/C'_{Fe}$

C'_{Fe} = concentración total de hierro que no está complejada con el citrato.

Los valores de las constantes de formación tabuladas de los complejos empleados fueron:

$$\text{Fe}^{3+}/\text{Cit.H}_2 = 10^{6.3}; \text{Fe}^{3+}/\text{Cit.H}^2 = 10^{11.9}; \text{Fe}^{3+}/\text{Cit.}^3 = 10^{25}.$$

* Cálculo de la constante de formación global condicionada a pH 5,0 para el anión fosfato en medio acuoso.

$$K_r = K_f \cdot \alpha \cdot \alpha_0 \quad (4.13)$$

donde: K_r = constante de formación global condicionada por el pH y por la presencia de agua.

$$= \frac{\text{concentración libre de } \text{PO}_4\text{H}_2^- \text{ en el equilibrio}}{\text{concentración de todas las especies iónicas no complejadas en el equilibrio}}$$

$$\alpha_0 = [\text{Fe}_{3+}]/C_{\text{Fe}}$$

$[\text{Fe}_{3+}]$ = concentración de hierro libre en el equilibrio.

C_{Fe} = concentración total de hierro no complejada con PO_4H_2^-

El valor de la constante de formación tabulada del complejo empleado fue: $\text{Fe}^{3+}/\text{PO}_4\text{H}_2^- = 10^{9.4}$.

Los valores de las constantes de formación condicionadas obtenidos fueron: $K_r(\text{pH } 5,0) = 4,0 \cdot 10^{31}$, para el hierro-citrato y $K_r(\text{pH } 5,0) = 1,08 \cdot 10^6$ para el hierro/fosfato. En base a estos resultados, se deduce que el ácido cítrico tiene una mayor capacidad para complejar al hierro que el ácido ortofosfórico y dado que este metal, al estado libre, cataliza reacciones de oxidación, el hecho de ser secuestrado en mayor grado por el ácido cítrico podría ser la causa de la menor destrucción registrada cuando se usa este acidificante.

Vidyasagar y Arya (1983) estudiaron el efecto de distintos ácidos orgánicos presentes en la fruta, sobre la estabilidad del ácido sórbico, a 37 °C, en soluciones acuosas que contenían 4 ml de una solución etanólica de ácido sórbico al 10 % (m/v) y 0,05 moles de acidificante (cítrico, fumárico, láctico, málico, maleico, oxálico y tartárico). En la Tabla 4.12 se detallan los resultados obtenidos por estos autores. En base a ella se concluye que el ácido cítrico y el málico ejercerían un efecto protector dado que cuando se usan para acidificar el sistema de pH 3,0 (sistema sin acidificante) a pH 2,2-2,3, la constante de velocidad no resulta afectada. En relación a los restantes ácidos empleados, parecerían ejercer un efecto acelerante; sin embargo, no es posible separar el efecto del acidificante per se del efecto de la disminución de pH, ya que en el trabajo la comparación se realizó con un sistema control cuyo pH es mayor.

Tabla 4.12: Efecto del acidificante sobre la velocidad de destrucción del ácido sórbico (Vidyasagar y Arya, 1983).

Acidificante	pH	constante de destrucción ($k \cdot 10^3 \text{ h}^{-1}$)
control	3,0	2,2 \pm 0,14
málico	2,3	2,3 \pm 0,16
maleico	1,7	2,8 \pm 0,18
oxálico	1,5	2,5 \pm 0,19
tartárico	2,2	2,9 \pm 0,21
fumárico	2,2	3,3 \pm 0,20
láctico	2,5	3,1 \pm 0,14
cítrico	2,2	2,1 \pm 0,14

En cuanto al efecto del ácido ortofosfórico o de distintas sales de fosfato, Arya (1980) encontró que la adición del ion fosfato tiene un efecto prooxidante sobre la degradación del ácido sórbico, dado que el agregado de Na_2HPO_4 o de Na_3PO_4 al 2% a una solución acuosa de ácido sórbico de pH 4,0, almacenada a 37 °C, provocaba un aumento de la constante de velocidad de reacción de $0,18 \cdot 10^{-3} \pm 0,02 \cdot 10^{-3}$ (hora⁻¹) a $1,77 \cdot 10^{-3} \pm 0,06 \cdot 10^{-3}$ (hora⁻¹) cuando el Na_2HPO_4 estaba presente.

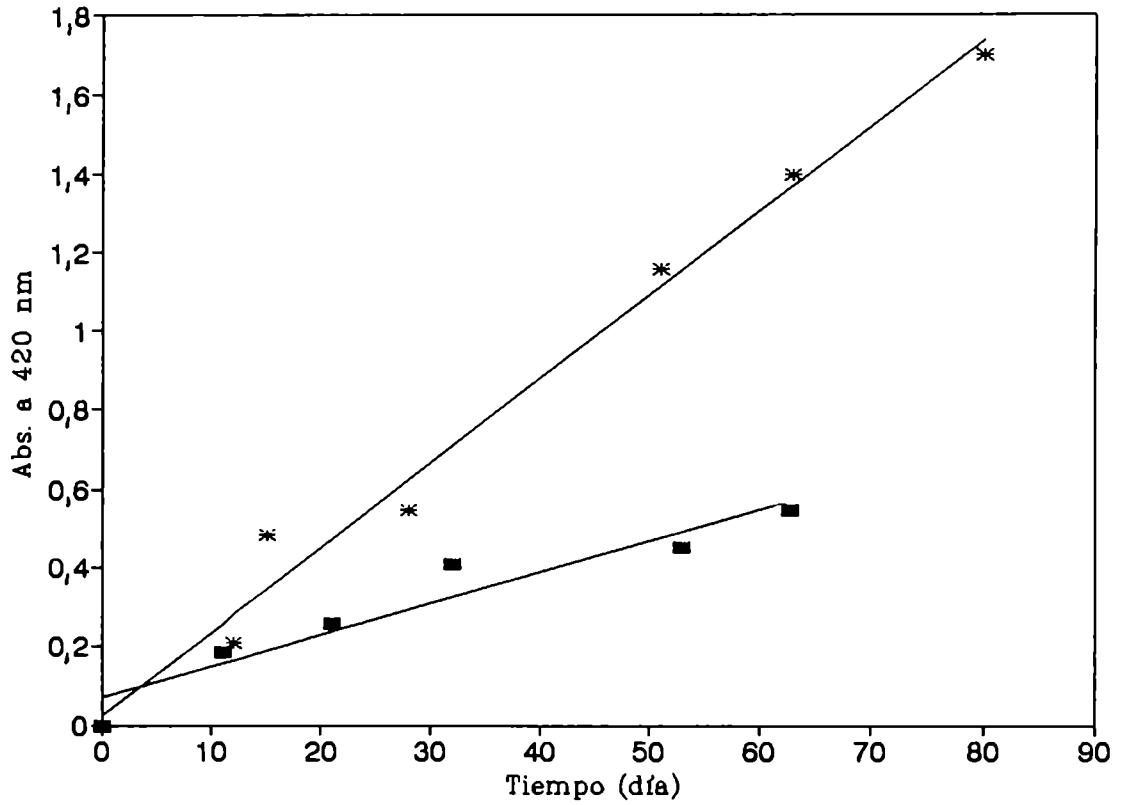
4.4.5.2 - Pardeamiento no enzimático

La Figura 4.15 ilustra el efecto del ácido cítrico y del fosfórico empleados para ajustar el pH a 5,0 sobre la velocidad de formación de pigmentos pardos. En ella se observa que cuando se emplea ácido cítrico, la velocidad de pardeamiento es menor que con fosfórico. En bibliografía se informa que los buffers de fosfato, citrato y acetato incrementan sustancialmente la velocidad de la reacción de Maillard en sistemas modelo acuosos, ya que actúan como catalizadores ácido-base (Reynolds, 1963; Saunders y Jervis, 1966). Pero no resulta claro cuál de ellos acelera la reacción en mayor medida.

Dado que en el sistema analizado, la fuente principal de grupos carbonilo serían los productos de degradación del sorbato, era de esperar que el acidificante que promovió en mayor grado la destrucción del sorbato (en este caso, el ácido fosfórico), también incrementase la velocidad de formación de pigmentos pardos.

Figura 4.15: Efecto del ácido cítrico y fosfórico sobre la velocidad de formación de pigmentos pardos a 57 °C, en presencia de NaCl, glicerol y glicina a pH 5,0.

■ cítrico; * fosfórico



Para ejemplificar el importante efecto que el acidificante empleado para regular el pH del sistema tuvo sobre la estabilidad del sorbato y sobre la velocidad de formación de pigmentos pardos, basta comentar que la vida media del preservador en el caso de emplear ácido cítrico fue de 101 días mientras que con ácido fosfórico se redujo a 48 días y que el tiempo necesario para alcanzar una absorbancia de 0,1 a 420 nm (aparición de color amarillento) fue de 12 días cuando se empleó ácido cítrico y disminuyó a 4 días en presencia de ácido ortofosfórico.

Restaino y col. (1982) reportaron, además, que el ácido cítrico aumentaba las propiedades inhibitorias de una solución 0,1 % de sorbato de potasio a pH 7,0, contra una amplia gama de microorganismos contaminantes comunes en alimentos. Huhtanen y col. (1983) demostraron que el cítrico aumenta las propiedades inhibitorias del sorbato de potasio contra el *Cl. botulinum*. Leistner y col. (1981) sugirieron que el citrato podría usarse como uno de una serie de obstáculos para la elaboración de productos cárnicos de alta humedad. Sin embargo, el empleo de ácido cítrico, en algunos alimentos, imparte un mayor sabor ácido que el fosfórico. Esto se debería probablemente a que, para lograr acidificar un producto a un dado valor de pH, se requiere una mayor cantidad de ácido cítrico que de fosfórico, debido a su menor grado de disociación.

4.4.6 - Influencia de la depresión de la actividad de agua a 0,91 y del humectante usado para ello

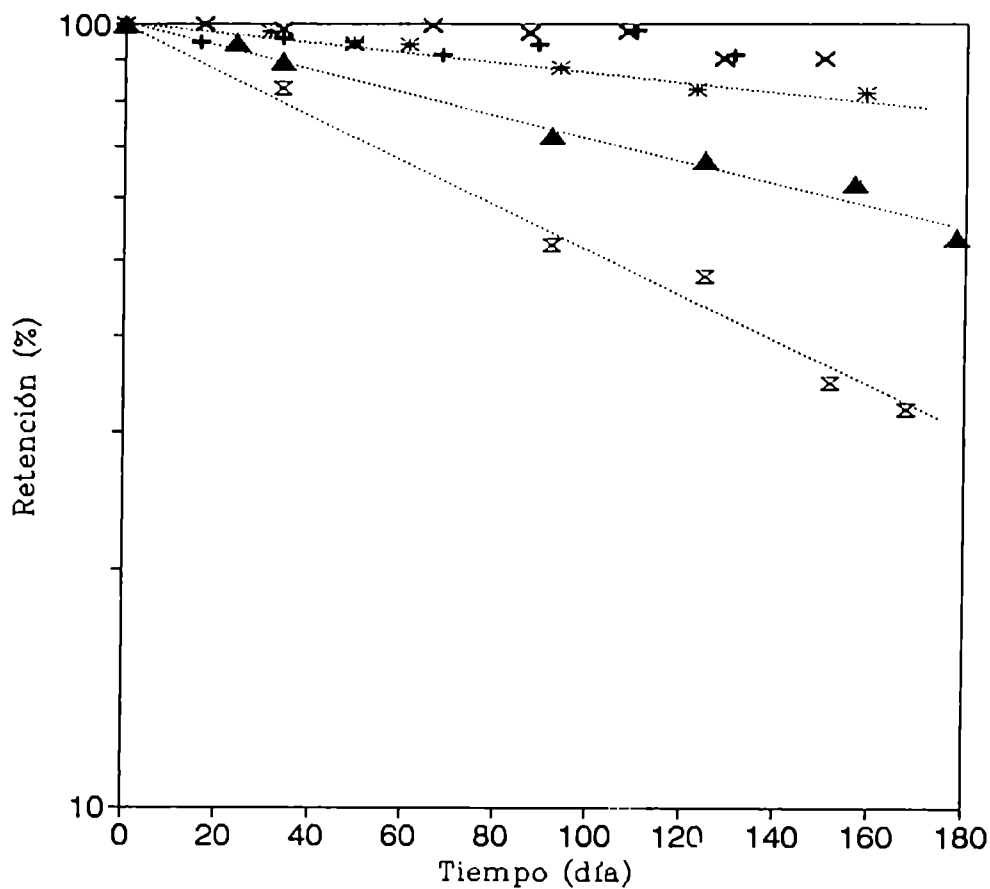
4.4.6.1 - Degradación del sorbato

En la Figura 4.16 se muestra el efecto de la depresión de la actividad de agua a 0,91 por la adición de distintos humectantes, sobre la destrucción del sorbato a 57°C. En ella se aprecia que: a) con excepción del caso en que se emplea glicerol, la disminución de la actividad de agua tiene un efecto protector sobre la degradación del sorbato, b) la magnitud del efecto depende del tipo de soluto adicionado, c) el uso de glicerol tuvo un efecto acelerante. Las tendencias observadas a 33 y 45 °C fueron las mismas (Tabla 4.6).

Es de destacar que en presencia de NaCl (sistema 2 y 6) ó NaCl, KCl y glicerol (sistema 5), el efecto protector fue tal que no se registraron pérdidas en el contenido de sorbato aún al cabo de 140 - 180 días de almacenamiento. En presencia de NaCl y glicerol (sistema 3) sólo se observó decaimiento a 57 °C y cuando el pH era 5,0 (Tabla 4.6).

Figura 4.16: Efecto de la depresión de la actividad de agua a 0,91 y de los distintos humectantes usados sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato de potasio a 57 °C en soluciones acuosas de pH 5,0.

▲ control (a_w 1,00); x NaCl ; ☒ glicerol;
* NaCl y glicerol; + NaCl, KCl y glicerol



Para analizar el efecto de la depresión de la actividad de agua sobre la degradación del ácido sórbico se deben tomar en consideración los diferentes tipos de efectos que ésta puede ejercer sobre la autooxidación del preservador. Estos son:

a) Disminuye el agua disponible para la asociación con un protón (del grupo carboxílico del ácido sórbico para formar el ion hidronio. Este paso es esencial para la disociación del ácido. En consecuencia, la depresión de la actividad de agua incrementaría la destrucción del preservador.

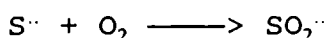
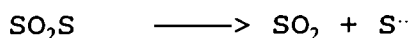
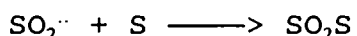
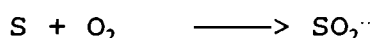
b) Incrementa la viscosidad del sistema, lo que podría aumentar la resistencia a la difusión disminuyendo la movilidad de los reactivos y, por ende, disminuyendo la destrucción.

c) Produce efectos específicos que dependen del humectante usado.

Probablemente, el efecto que prevalece depende de la composición del sistema y de las condiciones de trabajo.

En relación a los humectantes y/o mezclas de ellos analizados, excepto el caso en que se empleó como único humectante glicerol (sistema 3), se observó que la disminución de la actividad de agua tenía un efecto protector, el cual podría atribuirse al incremento de la viscosidad del sistema y/o a efectos específicos de los solutos.

Cuando se adicionó NaCl al 13,00 % (sistemas 2 y 6), el efecto protector fue de tal magnitud que, como ya se mencionó, no se detectaron pérdidas en el contenido del preservador a ninguna de las temperaturas estudiadas. El mismo efecto fue observado por Guerrero y col. (1990) quienes estudiaron la estabilidad de soluciones acuosas de sorbato de potasio (0,20 %, m/m) acidificadas a pH 5,0 por adición de ácido cítrico y con la actividad de agua deprimida al rango 0,91 - 0,98 mediante el agregado de distintas concentraciones de NaCl (3,50, 8,00 y 13,00 % m/m). Estos autores explicaron el efecto protector del NaCl al 13,00 % en base al cambio producido en la polaridad del solvente. De acuerdo con Pekkarinen (1969, a), la oxidación del ácido sórbico ocurre en un 40 % por adición de oxígeno al doble enlace ubicado entre los átomos de carbono 4 y 5 ($\text{CH}_3-\overset{1}{\text{C}}\text{H}=\overset{4}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$). El propone que la reacción procede a través de un mecanismo en cadena que comienza con la formación de un diradical:



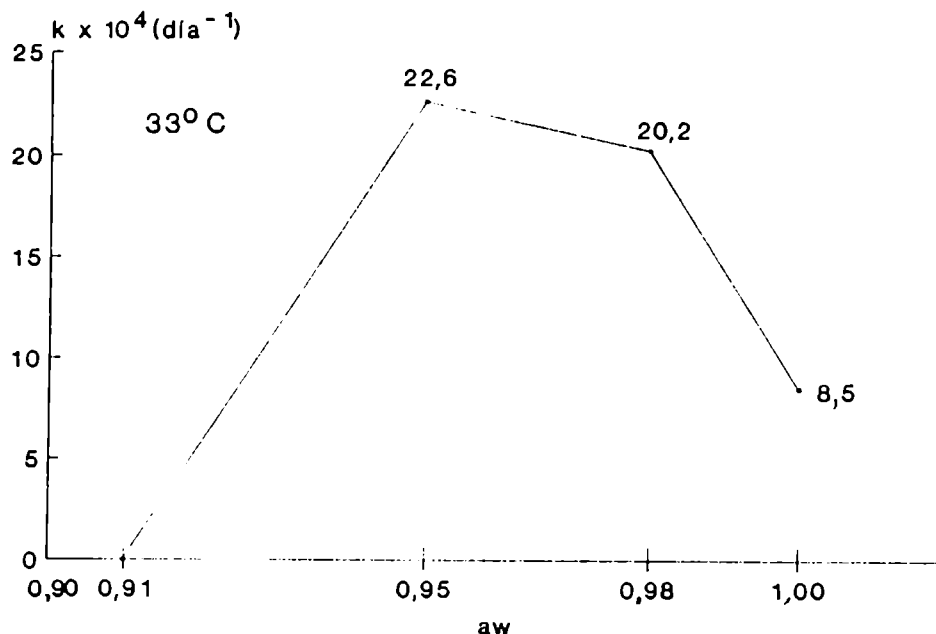
donde S: ácido sórbico

$\text{SO}_2^{\cdot\cdot}$: diradical

Reichardt (1979) ha reportado que pequeños cambios en la polaridad del solvente afectan la autooxidación de dobles enlaces, sugiriendo que la presencia de solventes polares incrementaría la velocidad de la etapa de propagación de la reacción y, por lo tanto, la velocidad global de la oxidación. Los hechos mencionados podrían explicar la acción protectora del NaCl al 13,00 %, ya que cuando se agrega esa concentración de sal al agua, la constante dieléctrica del medio y la polaridad disminuirían (Robinson y Stokes, 1968), el grado de solvatación decrecería y la velocidad global de oxidación del preservador también disminuiría.

Es de destacar que, Guerrero y col. (1990) no encontraron una tendencia clara al analizar el efecto de la actividad de agua en la destrucción del preservador. En base a sus datos, se ha realizado la Figura 4.17 en la cual se observa este hecho. Se concluye entonces que para interpretar los resultados obtenidos se deberían considerar algunas interacciones específicas NaCl - agua y que, por lo tanto, no sería posible analizar separadamente el efecto de la depresión de la actividad de agua del efecto del humectante adicionado.

Figura 4.17: Efecto de la depresión de la actividad de agua sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio en soluciones acuosas de NaCl.



Como se aprecia en la Fig. 4.16, el glicerol en cantidad suficiente para deprimir la actividad de agua a 0,91, acelera la destrucción del sorbato. Esta tendencia está en concordancia con la reportada por otros investigadores. Por ejemplo, Seow y Cheah (1985, a) al estudiar la degradación de los sorbatos en función de la actividad de agua en soluciones acuosas que contenían glicerol como humectante encontraron que la velocidad de la reacción de destrucción aumentaba con la disminución de la actividad de agua. Ello se muestra en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13: Efecto de la actividad de agua sobre la degradación del ácido sórbico en soluciones acuosas de glicerol a pH 4,0 (Seow y Cheah, 1985, a).

a_w	0,71	0,80	1,00
$k \cdot 10^2$ (día ⁻¹)	3,96	2,21	1,45

Probablemente en este trabajo y en el caso del sistema en el que se adicionó glicerol como único humectante, el efecto que prevaleció fue la disminución del grado de disociación que ocurre conforme se deprime la actividad de agua, a lo que se suma, según Seow y Cheah, el efecto prooxidante del glicerol. Por otra parte, cuando en este trabajo se empleó glicerol para ajustar la actividad de agua a 0,91 (sistema 3) se debió adicionar un 31,44 % (m/m) de este humectante. Esta concentración de glicerol en agua, provocó un incremento en el pK_a del ácido sórbico de 4,680 (agua a 25 °C) a 4,807. Este valor se calculó en base a la ecuación postulada por Pethybridge (1983):

$$pK_a = 4,680 + 0,0123 \cdot m - 2,66 \cdot 10^{-4} \cdot m^2 \quad (4.14)$$

donde $m = \% \text{ de glicerol (m/m)}$

Esta pequeña modificación en el valor del pK_a se traduciría en un incremento del porcentaje de ácido no disociado (α), a pH 5,0 de 32 a 39 en presencia de la solución de glicerol. Considerando que la fracción no disociada es la susceptible de degradarse (Arya, 1980), este factor sumado a los anteriormente expuestos, explicarían la tendencia observada.

La energía de activación en presencia de glicerol (Tabla 4.6, sistema 3) es significativamente mayor a la del sistema control (sistema 1). Esto evidencia una mayor sensibilidad frente al cambio de temperatura cuando se utiliza este humectante.

En la Tabla 4.14 se comparan los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato en presencia de glicerol, obtenidos en este trabajo, con los obtenidos por Gerschenson y col. (1987) y por Seow y Cheah (1985, a). En ella se observa que, los

valores de las constantes de velocidad obtenidos en este trabajo son del mismo orden que los reportados por Gerschenson, a diferencia de los informados por Seow y Cheah que son un orden mayor. Esto se debería probablemente a que estos autores trabajaron a pH 4,0 y a_w 0,80, dos factores que podrían incrementar la velocidad de la reacción. En cuanto a las energías de activación, los sistemas a pH 5,0 presentaron valores similares; a pH 4,0 y a_w 0,80, el valor reportado fue menor pero al no tener información de los errores involucrados en su estimación, no es posible evaluar lo significativo de las diferencias.

Tabla 4.14: Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato en presencia de glicerol.

Sistema	Temp. (°C)	pH	a_w	$k \cdot 10^3$ (día ⁻¹)	Ea (Kcal/mol)
agua/KS/glicerol	33			1,43	
	45	5,0	0,91	3,01	13
	57			3,23	
agua/KS/glicerol (Geschenson y col., 1987)*	20			0,14	
	30	5,0	0,91	0,93	14
	45			3,23	
agua/KS/glicerol (Seow y Cheah, 1985)#	40			22,1	
	50	4,0	0,80	36,3	8
	60			46,7	

* sistema acidificado con ácido cítrico y envasado en polipropileno, # sistema acidificado con ácido clorhídrico, no se informa el tipo de envase empleado,

Cuando se deprimió la actividad de agua con una mezcla de NaCl al 3,50 % y glicerol al 24,05 % (sistemas 4 y 8), se observó que esta combinación de humectantes disminuyó la destrucción del sorbato, ya que no se detectaron pérdidas en el contenido del preservador a 33 y 45 °C y la velocidad de la reacción de degradación a 57 °C es significativamente menor que la obtenida en el sistema de a_w 1,00 (Tabla 4.6). Obanu y col. (1977) estudiaron la degradación térmica del glicerol en sistemas modelo acuosos de humedad intermedia que contenían un 35 % de glicerol (pH 5,5) almacenados a 38 y 65 °C. Ellos observaron que la adición de un 9,5 % de NaCl aceleraba la oxidación del glicerol, la que se evidenciaba por el color amarillento que tomaba la solución con el transcurso del almacenamiento. En base a estos resultados, podría ser factible que, cuando se empleó la mezcla de NaCl al 3,50 % y glicerol al 24,05 %, la oxidación del glicerol haya precedido a la del sorbato, disminuyendo la disponibilidad de oxígeno del sistema y, en consecuencia, ejerciendo un efecto protector sobre la reacción de destrucción del sorbato. En un producto cárnico, el máximo tenor de NaCl admisible desde el punto de vista del sabor es 3,5 % (Ledward, 1981). Por lo tanto la mezcla de humectantes estudiada resulta de interés por sus potenciales aplicaciones.

Cuando se reemplazó parte del NaCl presente en la mezcla de humectantes antes citada por KCl (sistema 5), no se registraron pérdidas en el contenido de sorbato, ni siquiera a 57 °C. Esto sugiere que la adición de KCl al 1,05 % evita la destrucción del sorbato. Arya (1980) también observó el mismo efecto para soluciones 1 - 2 % de KCl.

García y col. (1993) analizaron la estabilidad del sorbato de potasio en pulpa de guayaba preservada por métodos combinados cuya actividad de agua se deprimió a 0,99, 0,97, 0,91 y 0,85 por adición de sacarosa. Estos autores encontraron que la degradación del sorbato aumentaba con el incremento de la actividad de agua. A modo de ejemplo, la constante de destrucción a actividad de agua 0,99 y a 30°C era $7,56 \cdot 10^{-3} \text{ día}^{-1}$, mientras que a actividad de agua 0,85 era $2,27 \cdot 10^{-3} \text{ día}^{-1}$. Por otra parte, se reportó la existencia de una correlación entre el logaritmo natural de la constante de velocidad y la inversa de la actividad de agua. Como ya hemos comentado, la sacarosa en concentraciones mayores al 5 % exalta la destrucción del preservador. Sin embargo, en este caso, el agregado de un porcentaje mayor al 5 % para deprimir la actividad de agua a 0,85, produjo una menor destrucción del sorbato probablemente por el fuerte efecto del aumento de la viscosidad del sistema.

Thakur y Arya (1991) estudiaron la degradación del sorbato en sistemas sólidos formados por celulosa microcristalina, ácido sórbico y glicina equilibrados a diferentes actividades de agua. En la Tabla 4.15 se muestran los resultados obtenidos los cuales indican un aumento de la velocidad con la actividad de agua. En este caso y en ausencia de humectantes con efectos específicos, probablemente, la influencia de la disminución de la viscosidad al incrementarse la actividad de agua fuese el factor que prevaleció.

Tabla 4.15: Efecto de la actividad de agua sobre la degradación del ácido sórbico en sistemas modelo sólidos almacenados a 37°C (Thakur y Arya. 1991).

Sistema	k.10 ² (día ⁻¹) a una a _w de :		
	0,57	0,73	1,0
A	0,53	1,09	1,9
B	0,15	0,58	1,2

El sistema A contiene un 99,80 % (m/m) de celulosa microcristalina y ácido sórbico al 0,20 % (m/m).

El sistema B contiene un 98,32 % (m/m) de celulosa microcristalina, ácido sórbico al 0,20 % (m/m) y 1,47 % (m/m) de glicina.

En base a todo lo comentado, podemos concluir que en presencia de humectantes, el efecto de la actividad de agua en la destrucción de los sorbatos debe analizarse en conjunto con los efectos específicos de los mismos.

4.4.6.2 - Pardeamiento no enzimático

En la Figura 4.18 se muestra el efecto de la depresión de la actividad de agua a 0,91, por la adición de distintos humectantes sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático a 57°C. En ella se aprecia que: a) con excepción del caso en que se emplea glicerol, la disminución de la actividad de agua tiene un efecto protector sobre el desarrollo de pardeamiento, b) la magnitud del efecto depende del tipo de soluto adicionado, c) el uso de glicerol tiene un efecto acelerante. Con respecto a 33 y 45 °C, las tendencias observadas fueron las mismas.

En presencia de NaCl (sistema 2 y 6), NaCl, KCl y glicerol (sistema 5) no se registró la formación de pigmentos pardos y como ya se mencionó, tampoco se registraron pérdidas en el contenido de sorbato aún al cabo de 140 - 180 días de almacenamiento a todas las temperaturas estudiadas. En presencia de NaCl y glicerol sólo se observó la formación de pigmentos y la destrucción de sorbato a 57 °C y cuando el pH era 5,0 (sistema 4). En este caso, la constante de velocidad fue significativamente menor que la observada tanto en ausencia de humectantes (sistema 1) como en presencia solamente de glicerol (sistema 3). En la degradación del sorbato se observó la misma tendencia.

En la Figura 4.19 se muestra el incremento de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo para el sistema conteniendo únicamente glicerol como humectante. Se observa un período de inducción, después del cual la absorbancia aumenta con el tiempo y la temperatura. Seow y Cheah (1985, a) reportaron que la velocidad de pardeamiento de soluciones de sorbato y glicerol, en general, disminuye al incrementarse la actividad de agua. Esta misma tendencia fue observada para soluciones de glucosa-glicina cuya actividad de agua era deprimida por la adición de glicerol (Eichner y Karel, 1972).

Con el objetivo de corroborar si el glicerol *per se* conduce a la formación de compuestos pardos, se almacenó una solución acuosa de glicerol (sistema 41) a 33, 45 y 57 °C. Los resultados indicaron que no se forman pigmentos pardos, ni siquiera al cabo de 180 días a 57 °C. El mismo comportamiento fue informado por Seow y Cheah (1985,b) al estudiar el potencial de pardeamiento de una solución acuosa de glicerol a pH 4,0 y a_w 0,80 almacenada a 40, 50 y 60 °C.

Figura 4.18: Efecto de la depresión de la actividad de agua a 0,91 y de los distintos humectantes usados sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático a 57 °C de soluciones de pH 5,0.

▲ control (a_w 1,00); x NaCl ; X glicerol;
* NaCl y glicerol; + NaCl, KCl y glicerol

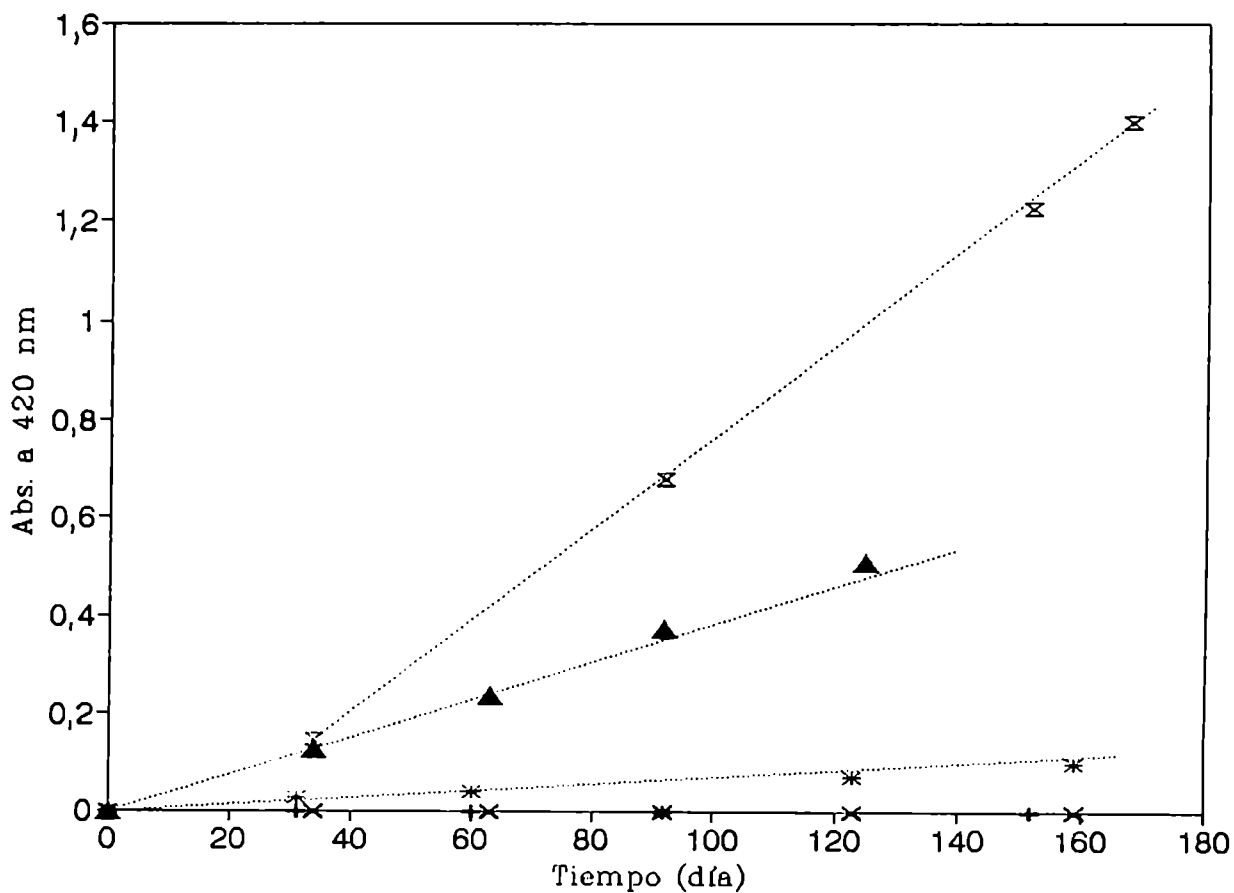
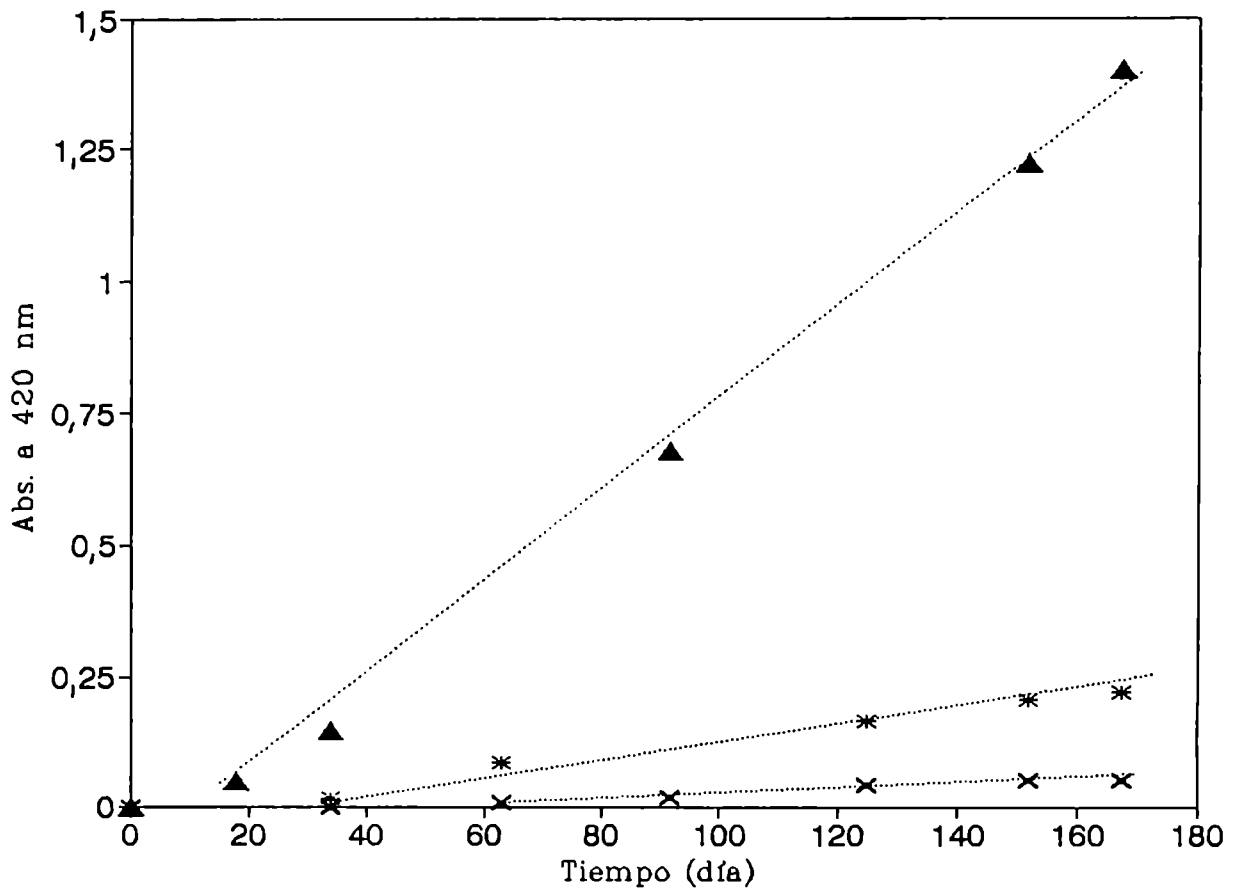


Figura 4.19: Efecto del tiempo y de la temperatura sobre el incremento de la absorbancia a 420 nm en un sistema de a_w 0,91 ajustado con glicerol a pH 5,0.

x 33 °C ; * 45 °C ; ▲ 57 °C



Obanu y col. (1977) estudiaron la degradación térmica del glicerol en sistemas modelo acuosos de humedad intermedia que contenían 35 % de glicerol a pH 5,5. Observaron que la adición de un 9,5 % de NaCl aceleraba la oxidación del glicerol, la que se evidenciaba por el color amarillento que tomaba la solución con el transcurso del almacenamiento. En base a este antecedente, en este trabajo, se analizó el potencial de pardeamiento de la mezcla de NaCl (3,50 %, m/m) y glicerol (24,10 %, m/m) (sistema 42) observándose que no se registraba un aumento de la absorbancia, a lo largo del almacenamiento, en el rango de 33 - 57 °C. En base a estos resultados, se concluyó que el agregado de un 3,50 % de NaCl al glicerol no promovería el pardeamiento de este último. Sin embargo este resultado no permite descartar que el NaCl acelere la oxidación del glicerol, ya que en las primeras etapas de la oxidación no se forman productos con absorbancia a 420 nm (Obanu y col., 1977).

Podríamos concluir, entonces, que la ausencia de pardeamiento verificada en algunos sistemas (Tabla 4.7, pág. 136) a lo largo del almacenamiento estaría vinculada con la nula destrucción del sorbato en los mismos determinando la ausencia de carbonilos activos para el pardeamiento.

Como se muestra en la Tabla 4.7, las constantes de velocidad a 33 y 45 °C, en presencia de glicerol a pH 5,0 (sistema 3), no presentan diferencias significativas con las obtenidas en ausencia de glicerol (sistema 1). Sin embargo, a 57 °C, el glicerol parecería aumentar la velocidad de pardeamiento. Es de destacar que cuando el glicerol es un componente del sistema aparece un período de inducción, lo cual indica que, de alguna forma, el glicerol interactúa con el sorbato. Las energías de activación de la reacción de pardeamiento en presencia de glicerol (sistema 3) y en su ausencia (sistema 1) no presentan diferencias significativas.

En la Tabla 4.16, se comparan los parámetros cinéticos de la reacción de pardeamiento en presencia de glicerol obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Seow y Cheah (1985, b). Como se observa en dicha tabla, los valores de las constantes de velocidad obtenidos en este trabajo fueron menores, aunque del mismo orden que los reportados por Seow y Cheah. Esta diferencia se debería, probablemente, a que estos autores trabajaron a pH 4,0 y a a_w 0,80 y, por lo tanto, obtuvieron una mayor destrucción del sorbato formándose una mayor cantidad de compuestos carbonílicos que pueden participar en el desarrollo de pardeamiento. En cuanto a las energías de activación, en este trabajo se obtuvo un valor más elevado. Sin embargo, como dichos autores no informan los errores asociados a su estimación, no es posible saber si las diferencias son significativas.

Tabla 4.16: Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato en presencia de glicerol.

Sistema	Temp. (°C)	pH	a _w	K.10 ³ (abs/día)	Ea (Kcal/mol)
agua/KS/glicerol	33			*0,4	
	45	5,0	0,91	*1,6	27
	57			*9,3	
agua/KS/glicerol (Seow y Cheah, 1985, b)#	40			*4,7	
	50	4,0	0,80	9,1	16
	60			22,6	

* presentan período de inducción.

sistema acidificado con ácido clorhídrico.

De todo lo antedicho, se puede concluir que el pardeamiento no enzimático inducido por los sorbatos está influenciado por la actividad de agua así como por el humectante usado para controlarla. Por ello, no parece posible analizar ambos efectos separadamente. Es también interesante destacar el paralelismo que existiría entre la degradación de los sorbatos y el pardeamiento no enzimático.

4.4.7 - Influencia de la presencia de glicina

4.4.7.1 - Degradación del sorbato

Pese a que existen en bibliografía algunos trabajos en los que se ha analizado el efecto de la presencia de aminoácidos en esta degradación, los resultados obtenidos fueron diversos y parecerían depender de la composición del sistema. En base a ello, se decidió estudiar el efecto del agregado de glicina en presencia de los humectantes previamente analizados, para clarificar su influencia.

En las figuras 4.20, 4.21, 4.22, y 4.23 se muestra el efecto del agregado de glicina sobre la retención de sorbato de potasio. En ellas se aprecia que, en todos los casos, la adición de glicina provocó un incremento en la velocidad de destrucción del sorbato a todas las temperaturas analizadas. Dicho incremento fue dependiente del tipo de soluto usado para deprimir la actividad de agua.

Figura 4.20: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio en presencia de NaCl a pH 5,0.

Sistema 2 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 9 □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

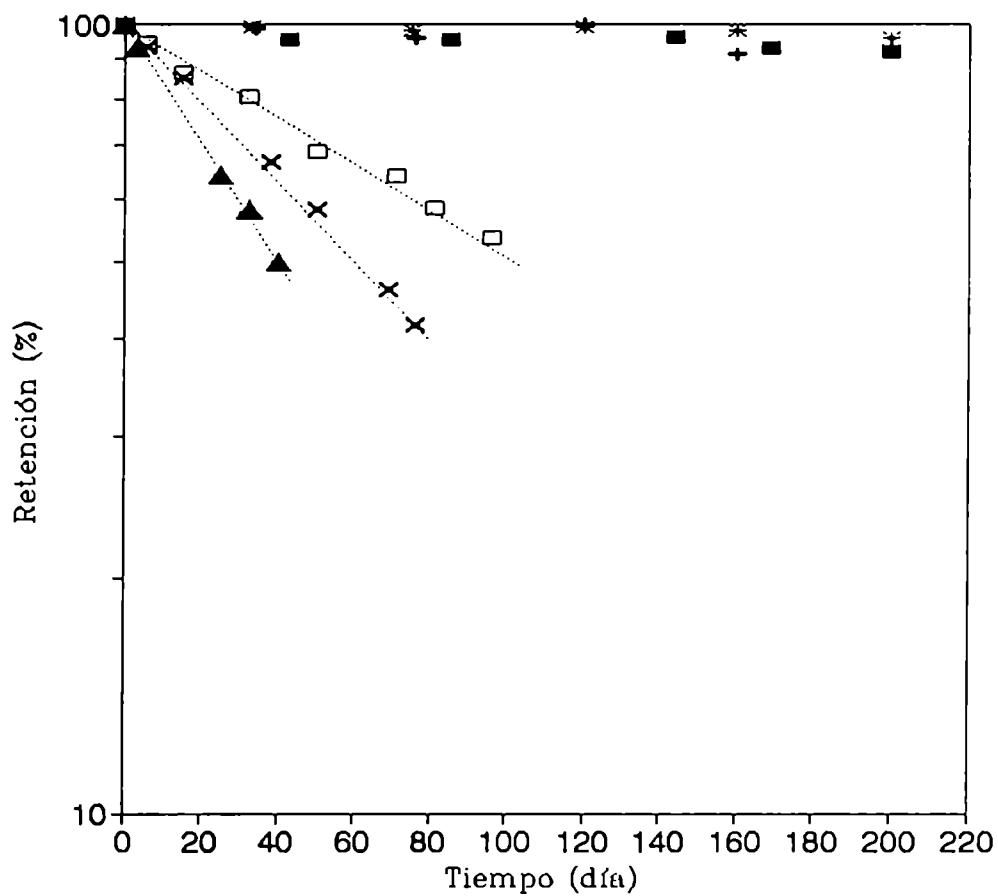


Figura 4.21: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio en presencia de glicerol a pH 5,0.

Sistema 3 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 10 □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

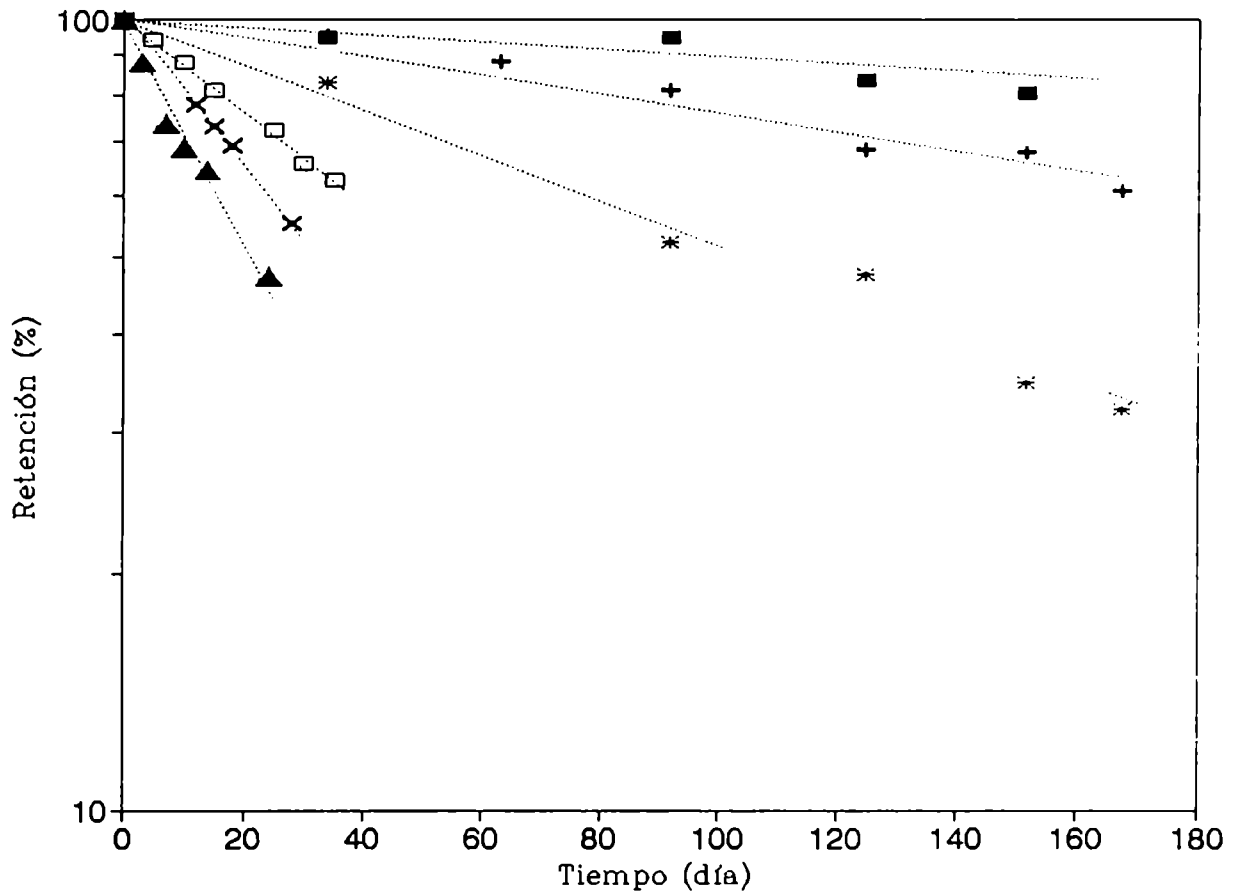


Figura 4.22: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema 4 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 11 □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

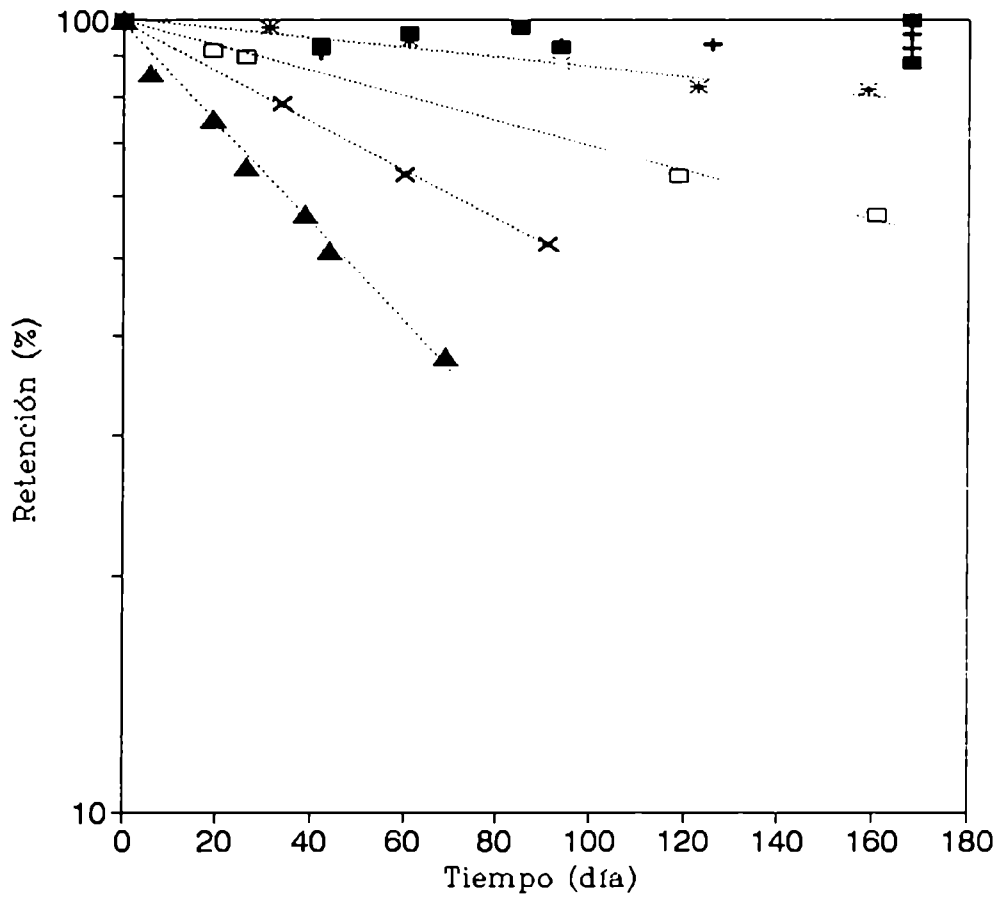
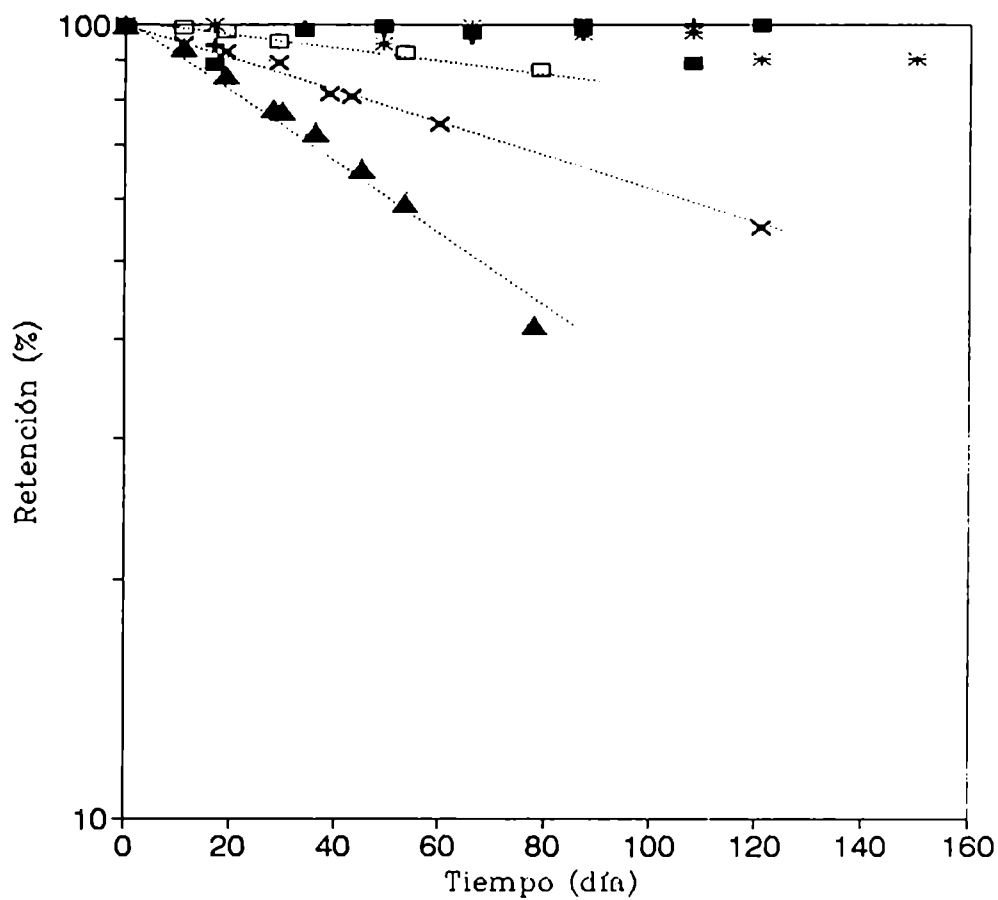


Figura 4.23: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio en presencia de NaCl y glicerol a pH 6,0.

Sistema 8 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 12 □ 33 °C ; x 45 °C ; ▲ 57 °C



En la Tabla 4.6 (pág. 134) se detallan los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción, en ella se observa que, a todas las temperaturas analizadas, el aumento de las constantes de velocidad de reacción en presencia de glicina sigue el orden:

$$k_{\text{NaCl/glicerol}} < k_{\text{NaCl}} < k_{\text{glicerol}}$$

o sea que el sistema con glicerol presenta la máxima velocidad de destrucción. Este comportamiento está relacionado al efecto prooxidante del glicerol antes citado. Sin embargo, la adición de glicina disminuye significativamente la sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura ya que, la energía de activación en presencia de glicerol (sistema 3) es 13 kcal/mol y se reduce a 7 kcal/mol cuando se agrega glicina (sistema 10).

Para visualizar la magnitud del efecto del agregado de glicina, se calculó, en base a las constantes de velocidad de reacción, el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de destrucción del preservador tanto en presencia como en ausencia del aminoácido (Tabla 4.17). Se observa que, en todos los casos, el agregado de glicina disminuyó en forma significativa la retención del sorbato. Este efecto fue más marcado cuando se empleó glicerol como humectante, ya que a 33 C el tiempo necesario para que se destruyese un 50 % del preservador fue mayor a 180 días en ausencia de glicina y fue de 52 días cuando este aminoácido estaba presente. Es de destacar que, en el sistema que contenía NaCl, glicerol y glicina (sistema 11), el tiempo de vida media del sorbato fue de 193 días, lo que destaca el efecto protector de esta combinación de humectantes sobre la destrucción del sorbato aún en presencia de glicina.

Previamente, Arya (1980) y Arya y Thakur (1988) habían reportado que la adición de distintos aminoácidos, entre ellos glicina, aumentaba la velocidad de destrucción del ácido sórbico. Estos autores analizaron la composición de los productos de degradación del ácido sórbico en solución acuosa y encontraron que los compuestos carbonílicos formados durante la oxidación estaban constituidos en un 80 % por acetaldehído y β -carboxiacroleína. Además, establecieron que el perfil de compuestos carbonílicos cambiaba en presencia de glicina. Ello se muestra en la Tabla 4.18 donde se aprecia que la proporción de β -carboxiacroleína y crotonaldehído disminuía y la de acetaldehído aumentaba en presencia del aminoácido. Ello se debería a la mayor tendencia que presentan los aldehídos insaturados a participar, junto con la glicina, en reacciones de condensación y polimerización formando pigmentos pardos. De esta forma se consumirían los productos formados por la degradación del sorbato y, en consecuencia, se aceleraría la velocidad global de la reacción de destrucción.

Arya y Thakur (1988) observaron que en presencia de glicina, las pérdidas de ácido sórbico eran mayores que en el sistema control.

Tabla 4.17: Efecto del agregado de glicina sobre el tiempo para alcanzar el 50 % de destrucción de sorbato.

Sistema	Temperatura (°C)	Tiempo para alcanzar el 50 % de destrucción (días)
agua/KS/NaCl (sistema 2)	33	N.R.D
	45	N.R.D
	57	N.R.D
agua/KS/NaCl/gly (sistema 9)	33	107
	45	61
	57	40
agua/KS/glicerol (sistema 3)	33	>180
	45	>180
	57	104
agua/KS/glicerol/gly (sistema 10)	33	52
	45	33
	57	22
agua/KS/NaCl/glicerol (sistema 4)	33	N.R.D.
	45	N.R.D
	57	>180
agua/KS/NaCl/glicerol/gly (sistema 11)	33	193
	45	96
	57	48

N.R.D = no se registró destrucción.al cabo de 200 días de almacenamiento.

Tabla 4.18: Cambios en la concentración de los carbonilos en la autoxidación de ácido sórbico, en presencia y ausencia de glicina (Arya y Thakur 1988).

	ACIDO SORBICO* Porcentaje de carbonilos totales a los 20 días de almacenamiento a 37 °C.	ACIDO SORBICO +GLICINA#
β- carboxi-acroleína	51,6	16,6
acetaldehído	38,7	75,0
acetona	7,3	8,3
crotonaldehído	1,2	0,4

*solución acuosa que contiene 0,2 % (m/m) de ácido sórbico,

#solución acuosa que contiene 0,2 % (m/m) y 1,0 % (m/m) de glicina.

Por ejemplo, a los 23 días de almacenamiento a 37 °C, en el sistema control (solución acuosa al 0,2 %, m/m de ácido sórbico) el contenido del preservador era un 60 % del valor inicial, mientras que en presencia de glicina era un 50 %.

Otros autores, encontraron que la adición de aminoácidos como glicina o lisina en presencia de azúcares disminuía la velocidad de degradación del sorbato. Por ejemplo, Thakur y Arya, (1991) estudiaron el efecto de la adición de glicina o lisina en la degradación a 37 °C del ácido sórbico en sistemas modelo formados por agua, glicerol y azúcar (glucosa o sacarosa) cuyo pH se ajustó a 4,3 mediante el agregado de ácido cítrico. En la Tabla 4.19 se muestran los resultados obtenidos por estos autores. Evidentemente, la adición de glicina o lisina disminuye la velocidad de destrucción. Este efecto es más pronunciado en el caso de adicionar glicina y si hay glucosa en el medio. Este diferente comportamiento de los aminoácidos respecto a la degradación del sorbato en función de la presencia o ausencia de azúcares estaría relacionado, según Thakur y Arya (1991), a la formación de melanoidinas (producto de la reacción de Maillard), las que se ha demostrado ejercen una acción antioxidante en la peroxidación de lípidos y retardan la rancidez en alimentos (Griffith y Johnson, 1957; Lingnert y Lundgren, 1980). Dada la similitud estructural del ácido sórbico con los lípidos, el mismo efecto podría esperarse sobre la oxidación de este preservador. Un efecto similar encontraron Gerschenson y col. (1986) cuando estudiaron la influencia del agregado de lisina al 1,72 % (m/m) sobre la estabilidad del ácido sórbico en soluciones de glucosa de a_w a 0,94 y cuyo pH se ajustó a 3,5 o 4,5 mediante el agregado de ácido cítrico. Estos autores encontraron que, al principio del almacenamiento a 45 °C, se observaba un incremento en la velocidad de reacción cuando había lisina y, aproximadamente, a los 50 días de almacenamiento, la velocidad de

reacción disminuía. Ellos postularon que este comportamiento se debería al poder inhibitorio de los compuestos producidos por la reacción de Maillard.

Tabla 4.19: Efecto de los aminoácidos en la degradación del ácido sórbico en agua-glicerol-glucosa y en agua-glicerol-sacarosa (Thakur y Arya, 1991).

Sistema	Constante de degradación ($k \cdot 10^2$ (día ⁻¹))
agua/HS/Glicerol/glucosa	1,23 ± 0,25
agua/HS/Glicerol/glucosa/gly	0,39 ± 0,07
agua/HS/Glicerol/glucosa/lys	0,56 ± 0,17
agua/HS/Glicerol/sacarosa	0,88 ± 0,23
agua/HS/Glicerol/sacarosa/gly	0,39 ± 0,16
agua/HS/Glicerol/sacarosa/lys	0,44 ± 0,18

HS: ácido sórbico; gly: glicina; lys: lisina

Evidentemente, el agregado de aminoácidos ejercería dos efectos: i) el incremento en la destrucción de los sorbatos, al consumir los productos de la misma y ii) la inhibición de la degradación del preservador por acción de las melanoidinas formadas. De acuerdo a la composición del sistema y a la concentración de melanoidinas presentes prevalecería alguno de esos efectos, produciendo las tendencias informadas.

4.4.4.7.2 - Pardeamiento no enzimático

En las Figuras 4.24, 4.25, 4.26 y 4.27 se ilustra el efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de pardeamiento. En ellas se aprecia que, en todos los casos analizados, la inclusión de este aminoácido aceleró significativamente la velocidad de pardeamiento.

Cabe destacar, entonces, que la adición de glicina, además de acelerar la destrucción del sorbato, aumentó en forma importante el desarrollo de reacciones de pardeamiento, en las que están involucrados los compuestos formados por la degradación del sorbato. Estos resultados están en concordancia con los reportados por distintos autores (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1984; Seow y Cheah, 1985, a y b; Gerschenson y col., 1986; Thakur y Arya, 1991).

Figura 4.24: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático en presencia de NaCl a pH 5,0.

Sistema 2 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 9 □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

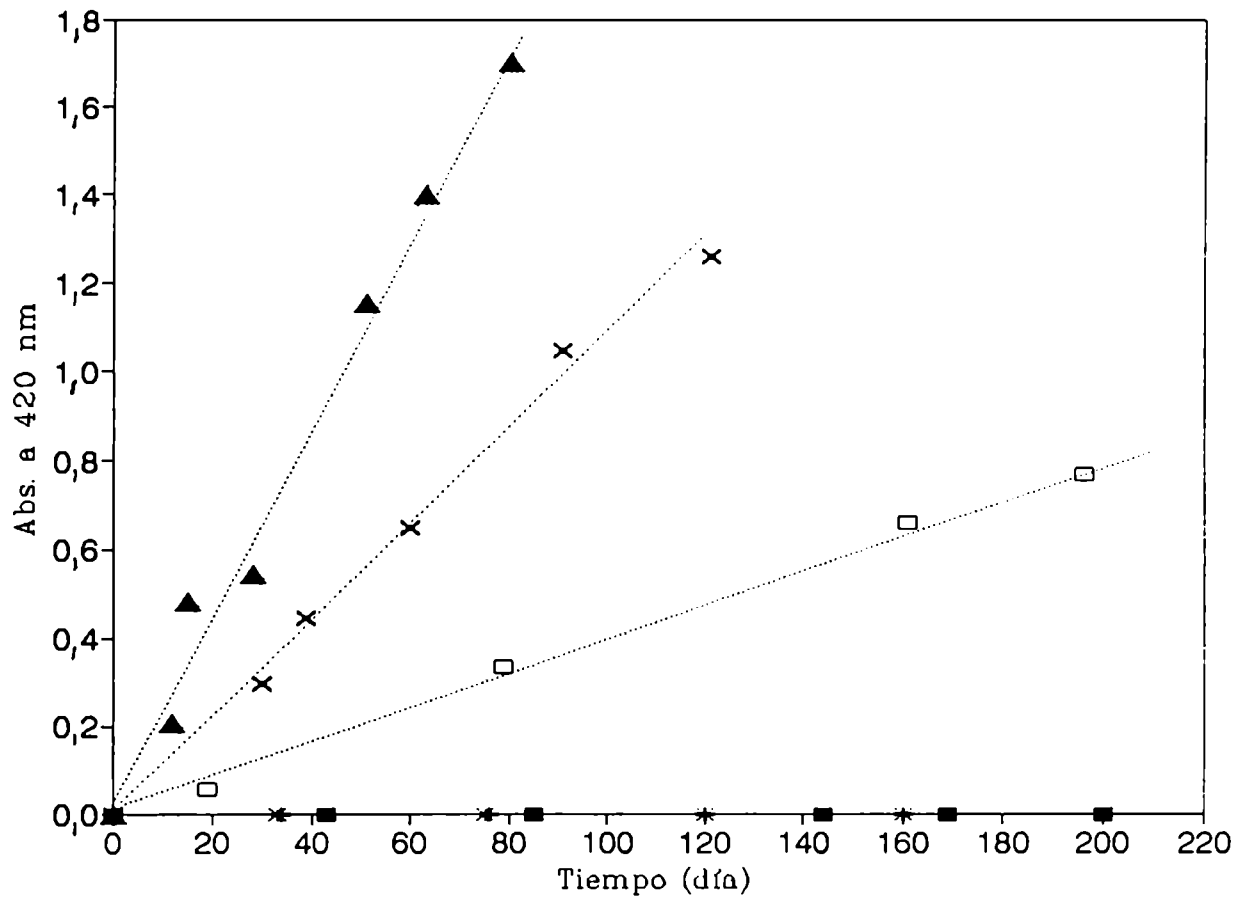


Figura 4.25: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático en presencia de glicerol a pH 5,0.

Sistema 3 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 10 □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

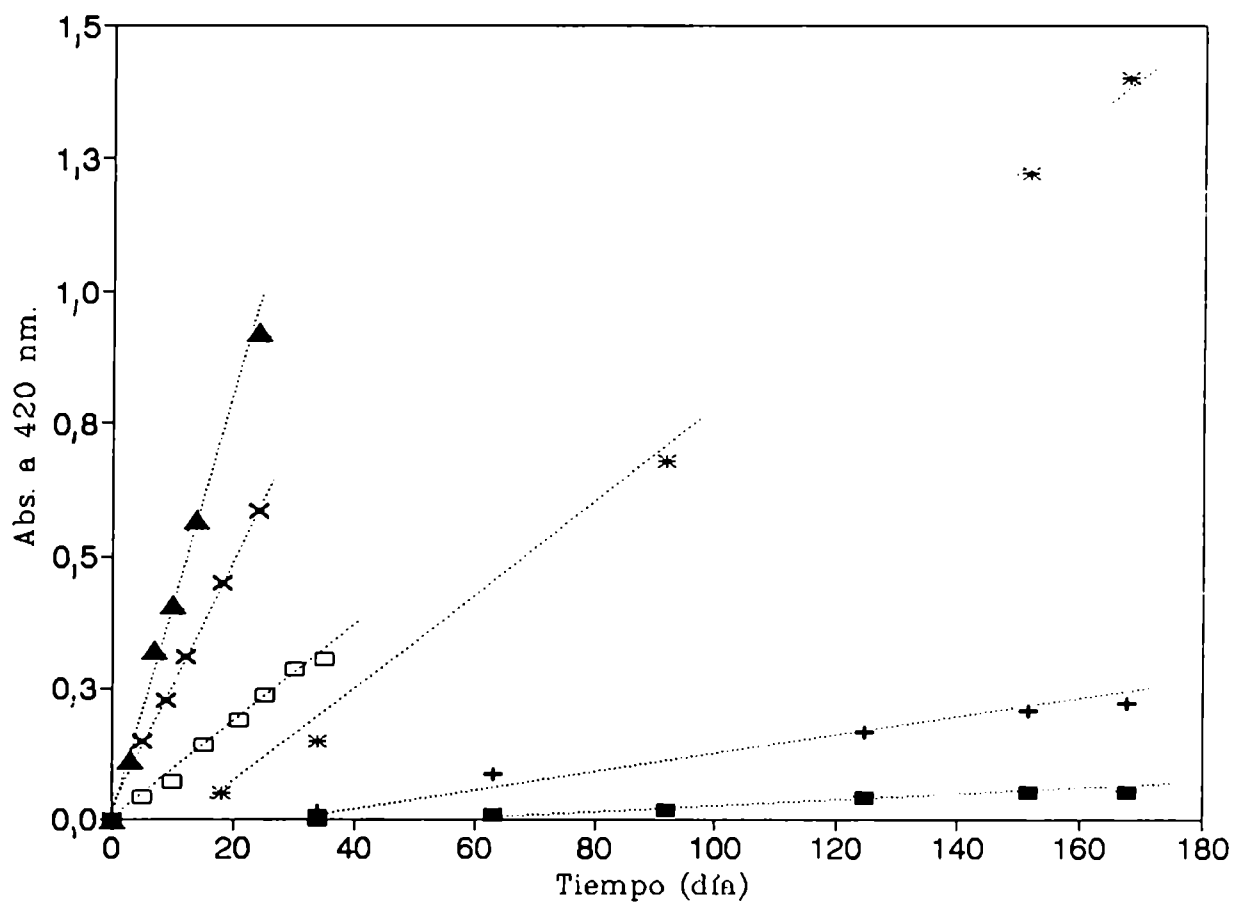


Figura 4.26: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema 4 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 11 □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

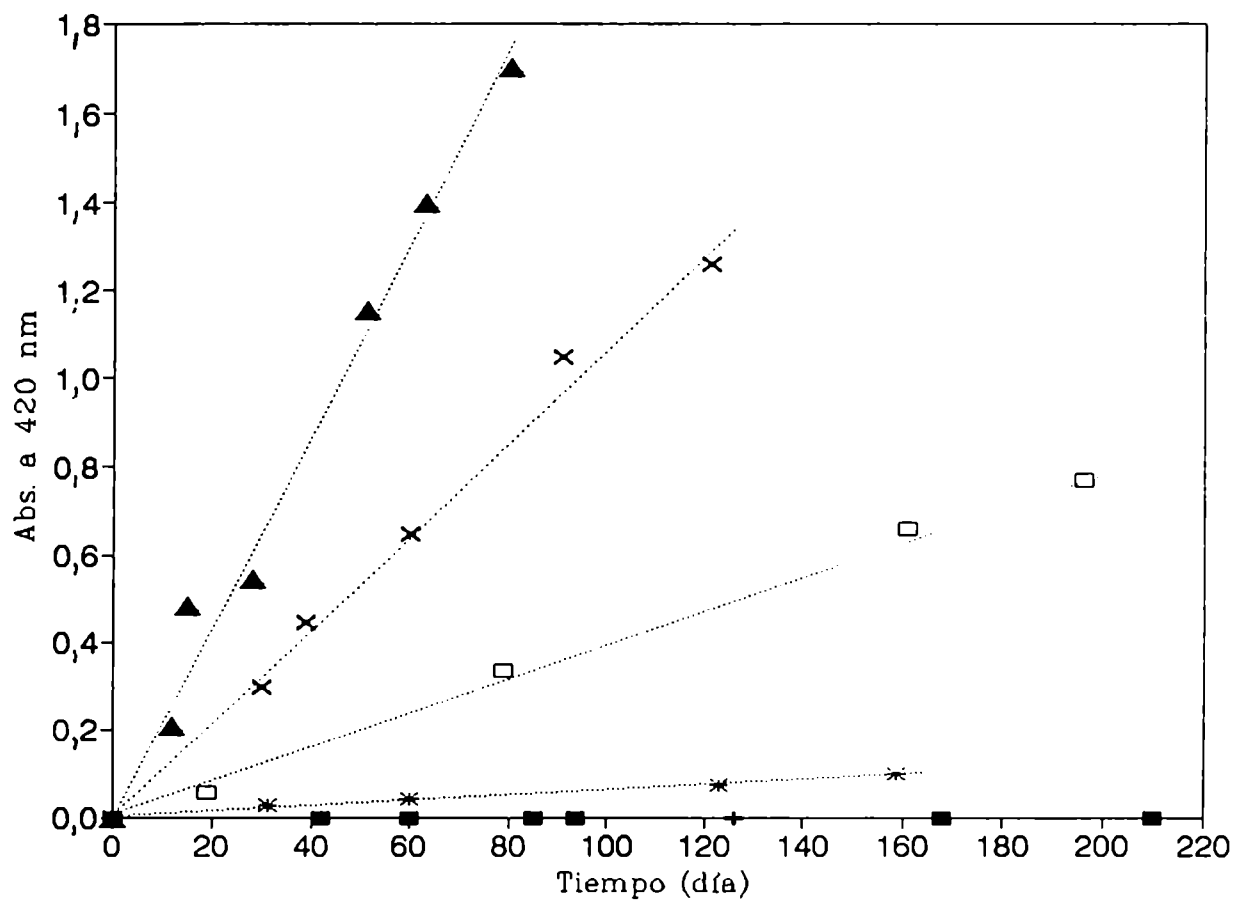
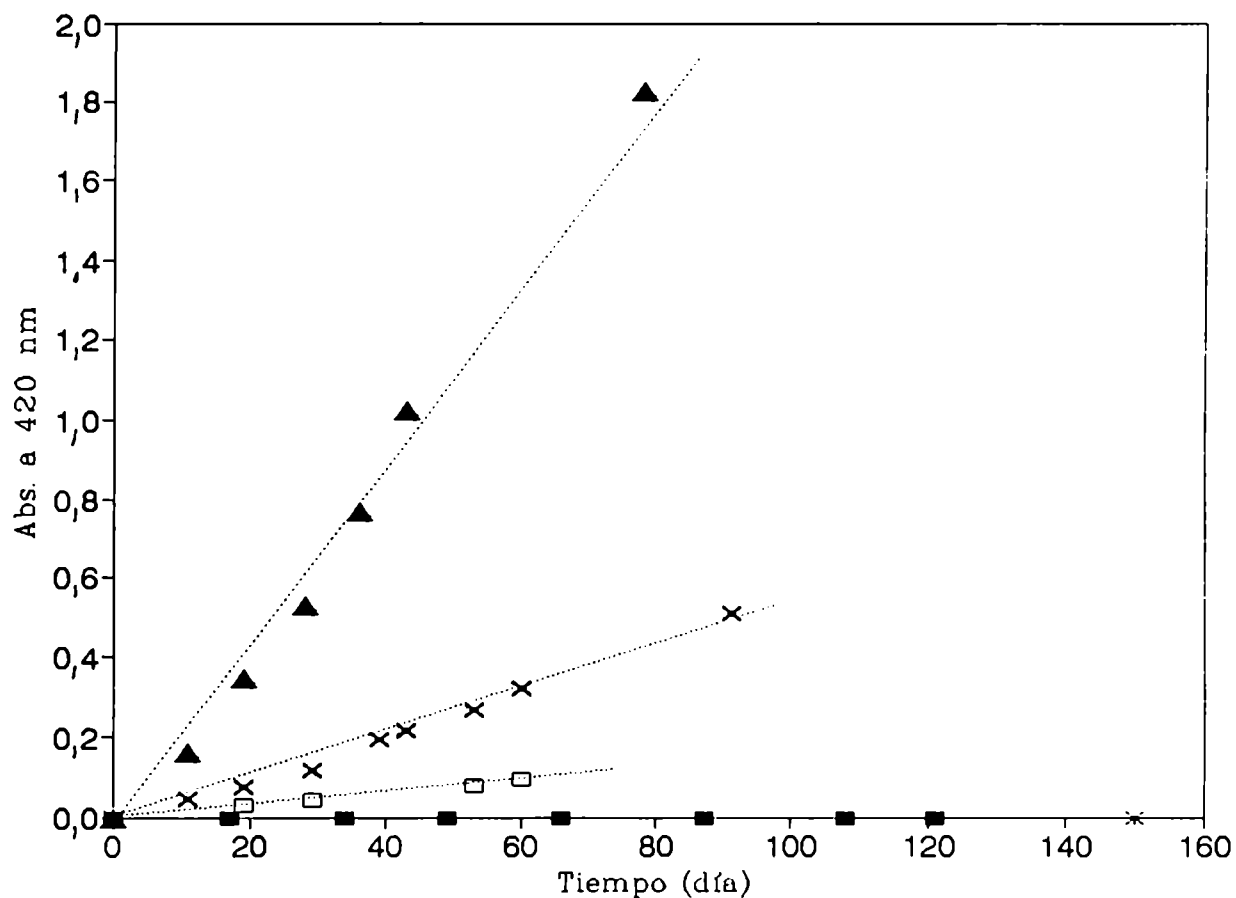


Figura 4.27: Efecto de la adición de glicina sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático en presencia de NaCl y glicerol a pH 6,0.

Sistema 8 ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema 12 □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C



En la Tabla 4.7 (pág. 136) se observa que los parámetros cinéticos de la reacción de pardeamiento en presencia de glicina (sistemas 9, 10 y 11) estuvieron influenciados por el soluto usado para deprimir la actividad de agua. El aumento de las constantes de velocidad de la reacción de pardeamiento siguió el orden:

a 33°C $k_{\text{NaCl/glicerol}} < k_{\text{NaCl}} \approx k_{\text{glicerol}}$

a 45°C $k_{\text{NaCl/glicerol}} < k_{\text{NaCl}} < k_{\text{glicerol}}$

a 57°C $k_{\text{NaCl}} < k_{\text{NaCl/glicerol}} < k_{\text{glicerol}}$

Este indica que, conforme se eleva la temperatura a 57 C, la menor velocidad de pardeamiento corresponde al sistema con NaCl (sistema 9). Probablemente, a esta temperatura, el NaCl presente en el sistema 11 ejerció un efecto exaltador de la oxidación del glicerol (Obanu y col., 1977) protegiendo así, al preservador. En general, la máxima velocidad de pardeamiento se observa en presencia de glicerol (sistema 10).

Para destacar la importancia del efecto acelerante de la adición de glicina sobre la velocidad de formación de pigmentos pardos, se calculó el tiempo y el porcentaje de destrucción de sorbato de potasio necesario para alcanzar una absorbancia de 0,1 a 420 nm, la cual se correlaciona con la aparición de color amarillento visible. Ello se muestra en la Tabla 4.20. En ella se aprecia que, en presencia de glicina, el tiempo necesario para la aparición de deterioro en el color y el grado de destrucción de sorbato necesario, se redujeron notoriamente. Por ejemplo, en el sistema que contiene glicerol como humectante, se necesitaron alrededor de 309 días a 33 °C y una destrucción de sorbato de potasio del 36 % para que la absorbancia a 420 nm sea de 0,1. Cuando se adicionó glicina, el tiempo se redujo a 11 días y la destrucción de sorbato de potasio necesaria fue del 14 %.

La marcada diferencia en cuanto a la velocidad de formación de pigmentos pardos, en presencia o ausencia de glicina, tendría relación con la naturaleza de las reacciones que dan origen al pardeamiento. En ausencia de glicina, los pigmentos pardos se forman por polimerización de los compuestos carbonílicos. En presencia de glicina, el pardeamiento se origina, además, por la reacción de los grupos carbonílicos antes mencionados con la glicina, vía reacción de Maillard (Seow y Cheah, 1985, b; Buera, 1986; Thakur y Arya, 1991). El potencial formador de pigmentos pardos de los productos de la reacción de Maillard es mayor que el de los compuestos carbonílicos (Seow y Cheah, 1985, b; Thakur y Arya, 1991), produciendo el mayor pardeamiento observado en presencia del aminoácido.

Tabla 4.20 : Tiempo y porcentaje de destruccion de sorbato de potasio necesarios para alcanzar una absorbancia a 420 nm de 0,1.

Sistema	Temp. (C)	Tiempo (dia)	Destruccion de KS (%)
3 (agua/KS/glicerina)	33	309	36
	45	88	20
	57	29	15
10 (agua/KS/glicerina/gly)	33	11	14
	45	4	7
	57	2	9
2 (agua/KS/NaCl)	33	----	----
	45		
	57	----	----
9 (agua/KS/NaCl/gly)	33	14	10
	45	10	10
	57	5	10
4 (agua/KS/NaCl/glicerina)	33	----	----
	45	----	----
	57	164	20
11 (agua/KS/NaCl/glicerina/gly)	33	25	10
	45	9	6
	57	4	10

KS: sorbato de potasio; gly: glicina.

El pH de todos los sistemas es 5,0.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0,91.

En la Tabla 4.21, se comparan los parámetros cinéticos de la reacción de pardeamiento en presencia de glicerol y glicina obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Seow y Cheah (1985, b). Los valores de las constantes de velocidad reportadas por dichos autores son de mayor magnitud que las halladas en este trabajo. La diferencia residiría probablemente en la diferencia de pH; como ya se comentó, a pH 4,0 la degradación del sorbato es mayor que a pH 5,0 y, por ende, lo es la cantidad de compuestos carbonílicos formados los cuales conducen a la formación de pigmentos pardos. Además, la concentración de sorbato por ellos adicionada fue de 2680 ppm frente a las 2000 ppm empleadas en este trabajo y el grado de pardeamiento, aumenta con la concentración del preservador (Vidyasagar y Arya, 1984; Obanu y Ledward, 1986).

Tabla 4.21: Parámetros cinéticos de la reacción de pardeamiento en presencia de glicerol y glicina.

Sistema	Temperatura (°C)	pH	a_w	$k \cdot 10^3$ (abs/día)	Ea (Kcal/mol)
agua/KS/glicerol/ gly	33	5,0	0,91	9,3	12
	45			24,2	
	57			38,5	
agua/glicerol/gly	33	5,0	0,91	N.R.P.	
	45			0,7	
	57			2,7	
agua/KS/glicerol/ gly (Seow y Cheah, 1985, b) #	40	4,0	0,80	25,7	6
	50			66,4	
	60			151	
agua/glicerol/gly (Seow y Cheah, 1985, b) #	40	4,0	0,80	1,9	25
	50			6,1	
	60			21,7	

KS: sorbato de potasio; gly: glicina.
sistema acidificado con ácido clorhídrico.
N.R.P.: no se registró pardeamiento.

Como puede notarse en la Tabla 4.21, la velocidad de pardeamiento de la combinación sorbato, glicerol, glicina es mucho mayor que de la combinación glicerol, glicina. Probablemente, esto se debería a que el sorbato presente, al destruirse, aportaría carbonilos que reaccionarían con la glicina (vía reacción de Maillard) y/o a la interacción sorbato-glicerol, ya observada, en ausencia de glicina (sección 4.4.7.2.2).

Los resultados analizados destacan el rol preponderante que desempeñan los sorbatos en el pardeamiento no enzimático, en presencia de glicina.

4.4.8 - Influencia del material de empaque

4.4.8.1 - Degradación de sorbato

El efecto del material de empaque sobre la reacción de destrucción del ácido sórbico ha sido ampliamente estudiado por distintos investigadores (Vidayasagar y Arya, 1983 y 1984; Thakur y Arya, 1991).

La velocidad de las reacciones de autooxidación está determinada por la tensión de oxígeno y por la naturaleza y concentración de los componentes del sistema que puedan tener una acción inhibitoria o catalítica. En envases cerrados, la tensión de oxígeno dependerá de la cantidad de oxígeno disuelto, de la cámara de aire y de la permeabilidad del material de empaque. Los envases de vidrio y las películas laminadas con aluminio son impermeables al oxígeno y brindan la máxima protección contra la oxidación. En cambio, cuando se emplean películas con una alta permeabilidad al oxígeno, se obtienen mayores pérdidas por oxidación.

Con el objetivo de evaluar la magnitud del efecto del material de empaque sobre la degradación del sorbato, el sistema 11 se almacenó también en frascos de polietileno de alta densidad.

En la Figura 4.28 se muestra el porcentaje de retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento a 57 °C, para una solución acuosa de sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina (sistema 11), envasado en vidrio y en polietileno de alta densidad. En la figura se observa que la velocidad de la reacción de destrucción fue significativamente mayor cuando se emplearon envases de polietileno, debido a la alta permeabilidad al oxígeno de este material, no obstante, el oxígeno disuelto en la cámara de aire fue suficiente para que ocurriese la oxidación del preservador, aunque a una menor velocidad, en los frascos de vidrio. En la Tabla 4.6 (pág. 134) se detallan las constantes de velocidad obtenidas en cada caso. En base a éstas, se concluye que el empleo de un material con mayor permeabilidad al oxígeno produce un aumento en la velocidad de destrucción.

Vidayasagar y Arya (1983) observaron que la degradación del ácido sórbico en homogenato de naranja almacenado en envases de polipropileno era del orden de 60 - 80 % y en envases de vidrio, son del 15 - 20 % después de 120 días a 37 °C. Además, ellos, analizaron el efecto de diferentes materiales de empaque sobre la velocidad de destrucción del ácido sórbico y sobre la formación de compuestos carbonílicos durante el almacenamiento de soluciones acuosas a 37 °C. Los resultados obtenidos por estos autores se detallan en las Tablas 4.22 y 4.23.

Figura 4.28: Efecto del material de empaque sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio a pH 5,0 y a 57 °C. en presencia de una solución acuosa de sorbato de potasio conteniendo NaCl, glicerol y glicina.

■ vidrio ; + polietileno de alta densidad

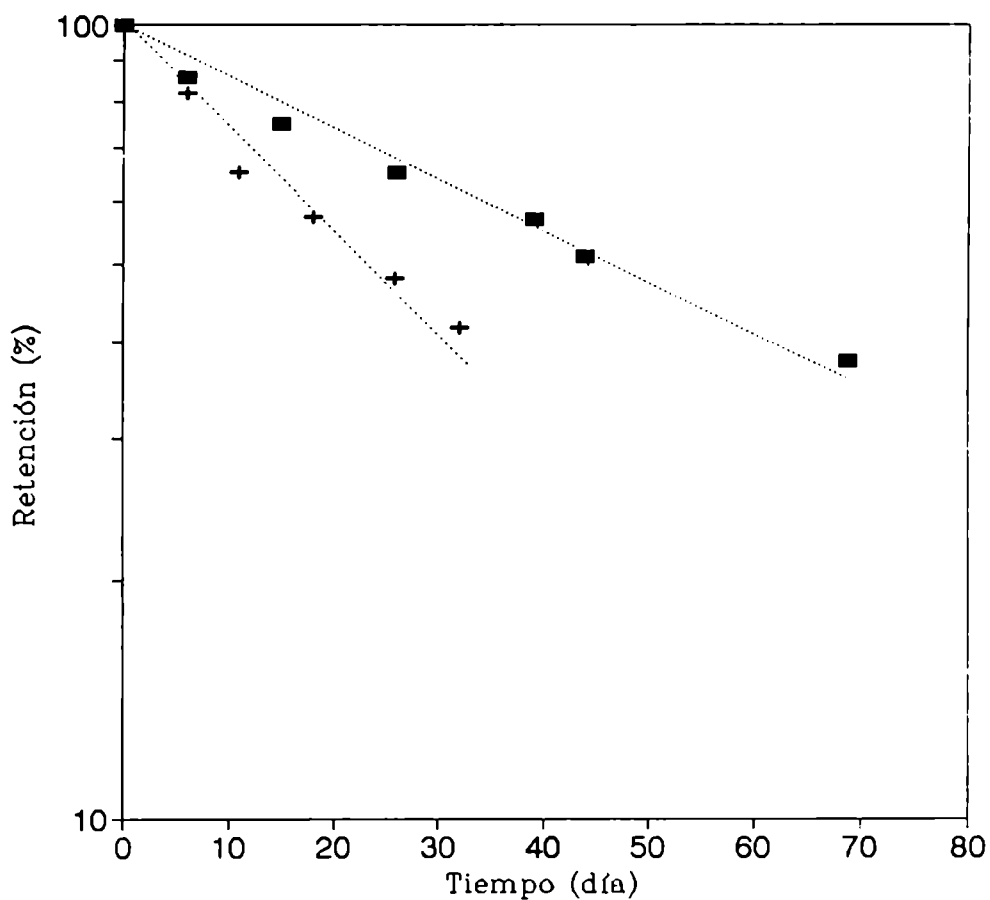


Tabla 4.22: Efecto del material de empaque sobre la velocidad de destrucción del ácido sórbico en solución acuosa a 37°C (Vidyasagar y Arya, 1983).

Material de empaque	Constante de velocidad $k \cdot 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
polietileno (75 μm)	5,45 \pm 0,16
polietileno de alta densidad (75 μm)	3,90 \pm 0,20
laminado de sarán-celofán (75 μm)	0,090 \pm 0,008
laminado de polietileno-aluminio	0,006 \pm 0,009

Tabla 4.23: Formación de compuestos carbonílicos en soluciones acuosas de ácido sórbico almacenadas a 37°C (Vidayasagar y Arya, 1983).

Material de empaque	Concentración de carbonilos totales (mg de glioxal/100 ml) después de :			
	5	7	10 (día)	21
polietileno (75 μm)	1,90	6,75	7,50	17,00
polietileno de alta densidad (75 μm)	1,28	5,74	6,77	13,90
laminado de sarán-celofán (75 μm)	0,33	0,48	0,94	0,94
laminado de polietileno- aluminio	0,14	0,20	0,24	0,26

En la Tabla 4.22, se observa que la velocidad de degradación del ácido sórbico almacenado en el laminado de sarán-celofán y en el laminado de polietileno-aluminio fue mínima en relación a la obtenida cuando se emplearon películas de polietileno. Estos resultados se correlacionan con el aumento en la concentración de grupos carbonilo que se produjo a medida que transcurre el almacenamiento (Tabla 4.23). Previamente, Arya (1980) había reportado que la destrucción del ácido sórbico se correlacionaba con el aumento en la concentración de grupos carbonilo.

En base a los resultados comentados, es evidente que se debe seleccionar cuidadosamente el material de empaque a fin de minimizar las pérdidas del preservador durante el almacenamiento del alimento.

4.4.8.2 - Pardeamiento no enzimático

En la Figura 4.29 se observa que la velocidad de pardeamiento del sistema acuoso conteniendo sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina fue mucho mayor cuando el almacenamiento se realizó en envases de polietileno.

El comportamiento mencionado se debió, probablemente, a que los envases de polietileno, debido a su elevada permeabilidad al oxígeno, aceleraron la destrucción del sorbato y, por ende, la formación de compuestos carbonílicos. Estos, junto con la glicina condujeron a la formación de pigmentos pardos a través de la reacción de Maillard.

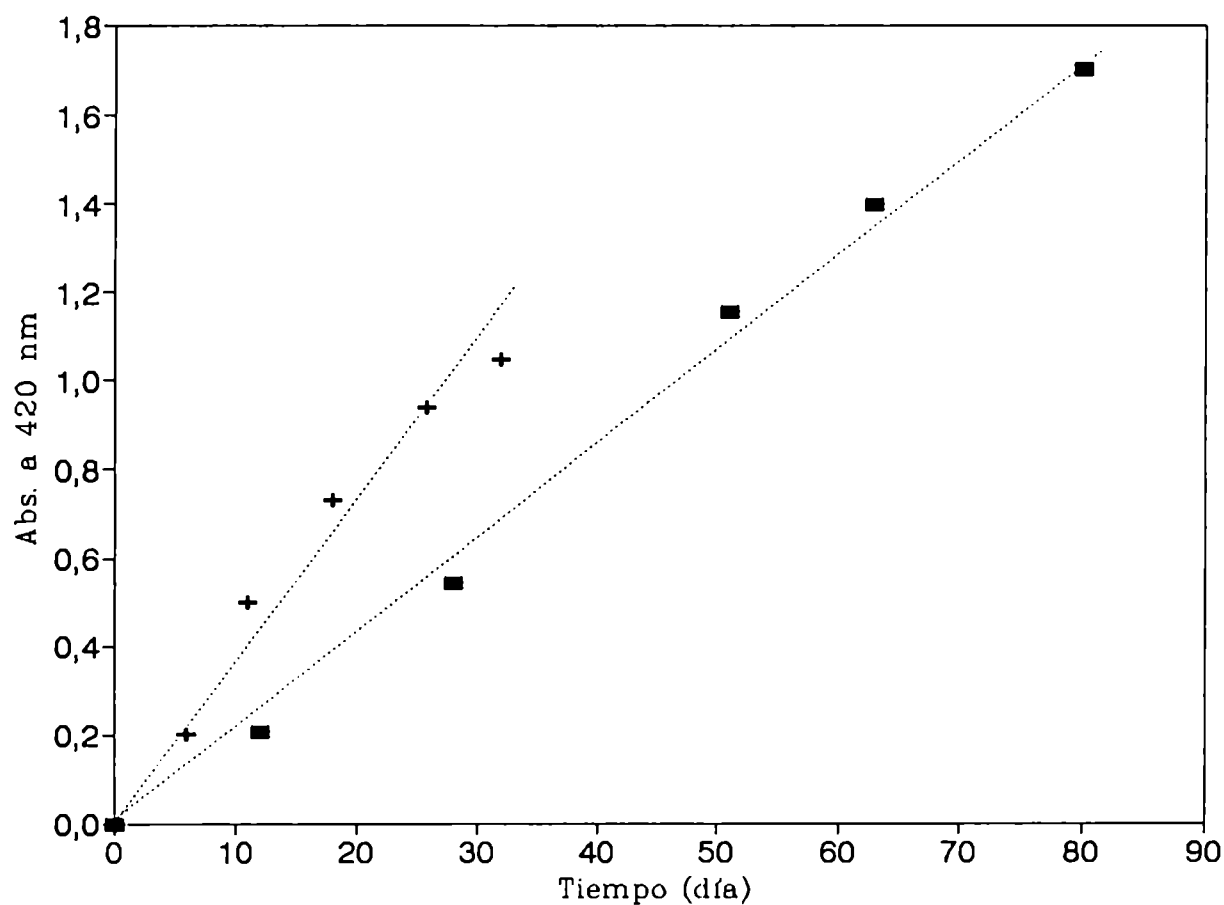
Vidyasagar y Arya (1983) reportaron la misma tendencia al estudiar el pardeamiento no enzimático de pasta de pescado y de homogenatos de frutas.

4.4.9 - Influencia de distintos aditivos

En esta sección se analizará el efecto de distintos aditivos sobre la estabilidad de los sorbatos, con especial énfasis en aquellos que se emplean en la formulación de carnes curadas ya que, como se comentó previamente, una de las aplicaciones de los sorbatos es su adición a productos curados con el objetivo de disminuir el tenor de nitritos de los mismos, por razones de salubridad. Si bien en bibliografía se reportan numerosos estudios acerca de la acción antimicrobiana del sorbato en carnes y en sistemas modelo, no existe información relacionada con la estabilidad de este preservador, ni acerca del efecto, en la misma, de la presencia de los distintos aditivos que componen los productos cárnicos autoestables. Entre ellos, se encuentran los componentes de las sales de cura que son: nitrito de sodio, sacarosa, ácido ascórbico, polifosfatos. Además de antioxidantes, tales como propilgalato y EDTA.

Figura 4.29: Efecto del material de empaque sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático a 57 °C de un sistema acuoso de pH 5,0 conteniendo sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina.

+ polietileno de alta densidad; ■ vidrio



Se decidió trabajar con la mezcla de NaCl al 3,50 % y glicerol en cantidad suficiente para ajustar la actividad de agua a 0,91, debido a que esta combinación de humectantes mostró ser, dentro de las posibilidades analizadas, la que brindaba mayor protección contra la degradación del preservador, además de resultar adecuada desde el punto de vista del tenor de NaCl. Se trabajó a pH 5,0, por ser un valor de pH al cual, la efectividad antimicrobiana del preservador es mayor que en condiciones más básicas. Se prefirió emplear ácido ortofosfórico, en lugar de ácido cítrico, como acidificante ya que, en general, otorga mejores características organolépticas a un alimento cárnico (Argaíz y col. 1993).

4.4.4.9.1 - Influencia de la sal disódica del ácido etilen-diamino tetraacético (EDTA)

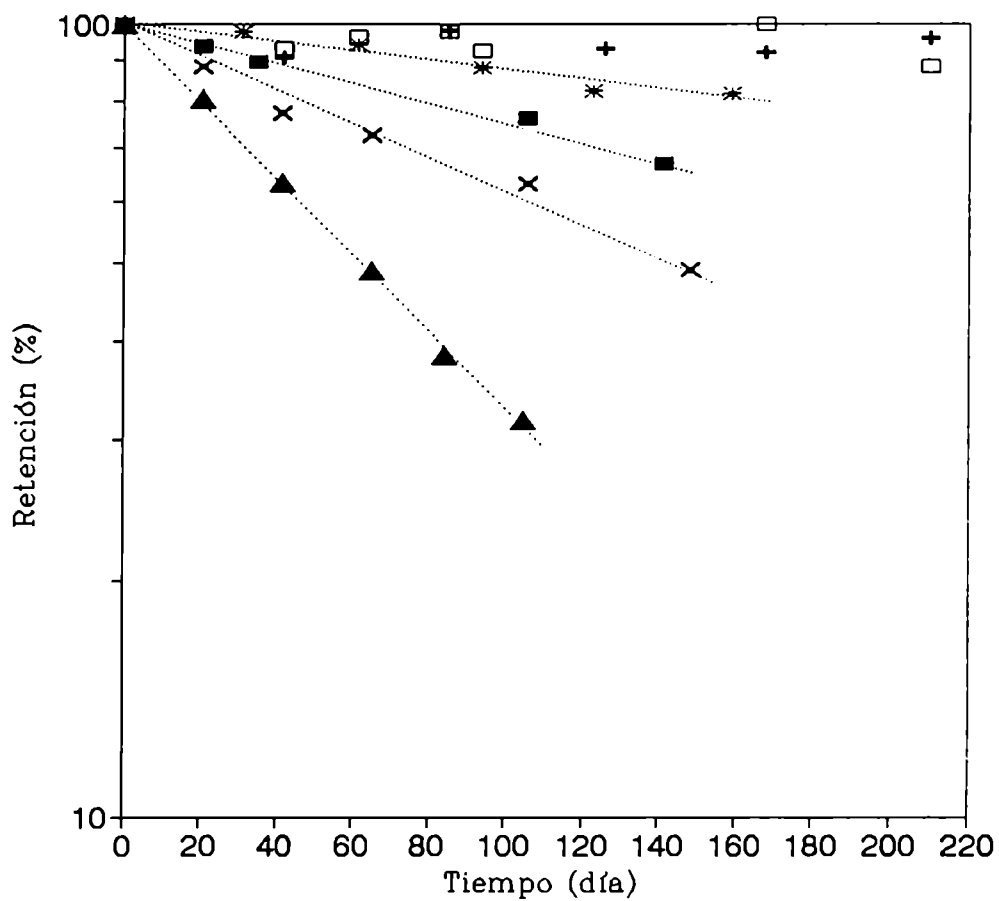
El EDTA se adiciona a alimentos con el objetivo de retardar la oxidación de los lípidos, que es la mayor causa de disminución de la calidad, en la carne, a lo largo del almacenamiento (Ledward, 1981). En los productos cárnicos, la presencia de enzimas oxidativas, los hemo-compuestos, las trazas de metales como hierro y cobre, la presencia de sales etc,, tienen una gran influencia sobre la oxidación de lípidos. Cuando se adiciona EDTA, éste se combina con los metales formando complejos y, por lo tanto, disminuye la oxidación de los lípidos. Debido a la similitud estructural del ácido sórbico con los ácidos grasos, es posible esperar el mismo efecto sobre la degradación oxidativa de este preservador.

4.4.4.9.1.1 - Degradación del sorbato

En la Figura 4.30 se muestra el efecto de la adición de EDTA (500 ppm) sobre el porcentaje de retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento a 33, 45 y 57 °C en un sistema acuoso conteniendo NaCl y glicerol. En ella se observa que la presencia de EDTA produjo un incremento significativo de la velocidad de reacción. Así, en ausencia de EDTA no se observaron pérdidas a 33 y 45 °C que sí se verificaron en su presencia. A 57 °C, la constante de velocidad de la reacción fue $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ día}^{-1}$ pero, en presencia de EDTA (sistema 14) fue $10,6 \cdot 10^{-3} \text{ día}^{-1}$, lo que indica que el EDTA aumenta la destrucción del sorbato.

Figura 4.30: Efecto de la adición de EDTA sobre el porcentaje de retención de sorbato de potasio en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema sin EDTA (4) □ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C
Sistema con EDTA (14) ■ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C



Con el objetivo de estudiar la posibilidad de que el EDTA estuviese participando de la reacción, se analizó el efecto de la adición de otras concentraciones de EDTA a 57 °C. En la Tabla 4.24 se detallan los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato en presencia de EDTA, en envases de vidrio y plástico. En ella se observa que las constantes obtenidas cuando se adicionaron 100, 250, 500 o 1000 ppm de EDTA (sistemas 15, 16, 14 y 17 respectivamente) fueron prácticamente iguales. Considerando que el empleo de 100 ppm de EDTA excluye la posibilidad de saturación, se concluyó que este aditivo actuaba como un agente catalizador positivo sobre la destrucción del sorbato.

Para descartar la posibilidad de que la acción acelerante del EDTA sobre la destrucción del sorbato se debiera a su interacción con los humectantes, se analizó el efecto de la adición de 500 ppm de EDTA a una solución acuosa de sorbato de potasio almacenada en envases de vidrio y de polietileno de alta densidad a 57 °C. Los resultados obtenidos (Tabla 4.24) muestran que se produjo un aumento significativo en la velocidad de destrucción que se reflejó en un incremento de la constante de velocidad de $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ día}^{-1}$ (sistema 1) a $16,3 \cdot 10^{-3}/\text{día}$ (sistema 18) cuando se emplearon envases de polietileno, se observó igual tendencia. Esto indica que, independientemente de la presencia de NaCl y glicerol, el EDTA ejerció una fuerte acción prooxidante. Sin embargo, este efecto es de mayor magnitud en presencia de NaCl y glicerol ya que, en este caso, la constante de velocidad se incrementó 6,5 veces, mientras que cuando se adicionó EDTA a una solución acuosa de sorbato, el incremento fue de 4 veces.

El EDTA se adiciona con el objetivo de complejar metales, en particular hierro, disminuyendo las reacciones de oxidación catalizadas por la presencia de este catión. Además, en algunos casos, se ha reportado que los complejos EDTA-hierro son agentes catalizadores de reacciones de oxidación (Mahoney y Graf, 1986). En base a estos antecedentes, se analizó el contenido de hierro presente en alguno de los sistemas estudiados y el aporte de hierro de sus componentes. En la Tabla 4.25 se reportan los resultados obtenidos. En ella se observa que, la contribución de hierro del agua, el sorbato de potasio y el EDTA fue despreciable en relación al aporte del ácido ortofosfórico. Pero, cuando se analizó el contenido de hierro al cabo de 42 días de almacenamiento, se observó que en presencia de EDTA (sistema 18), éste fue de 0,300 ppm, es decir, un orden mayor que el contenido inicial del sistema y que el contenido del sistema almacenado en iguales condiciones, pero en ausencia de EDTA (sistema 1). Estos resultados indicarían que, el EDTA tiene la capacidad de arrancar iones hierro del vidrio del envase.

Cuando se emplearon envases de polietileno, se observó la misma tendencia, ya que el contenido de hierro en presencia de EDTA fue 0,450 ppm, al cabo de 42 días de almacenamiento, mientras que en ausencia de este aditivo (sistema 1), el contenido fue 0,010. Esto indica que el EDTA también arrancaría iones hierro del envase plástico.

Tabla 4.24: Constantes de velocidad de la reacción de destrucción del sorbato de potasio.

Sistema	Temperatura (° C)	$(k \pm d)10^3$ (día ⁻¹)
1 (agua/KS)	57	3, 2 ± 0, 1 ab
1 (agua/KS) #	57	13, 5 ± 1, 1 ae
18 (agua/KS/EDTA, 500 ppm)	57	18, 3 ± 0, 9 bc
18 (agua/KS/EDTA, 500 ppm) #	57	21, 1 ± 1, 0 ce
4 (agua/KS/NaCl/glicerol)	57	1, 40 ± 0, 1 dfgh
15 (agua/KS/NaCl/glicerol/ EDTA, 100 ppm)	57	10, 6 ± 0, 8 d
16 (agua/KS/NaCl/glicerol/ EDTA, 250 ppm)	57	11, 0 ± 0, 3 f
14 (agua/KS/NaCl/glicerol/ EDTA, 500 ppm)	57	10, 6 ± 0, 3 g
17 (agua/KS/NaCl/glicerol/ EDTA, 1000 ppm)	57	10, 5 ± 0, 4 h

KS: sorbato de potasio.

d : desviación estándar.

Las constantes de velocidad (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0, 95)

Sistemas almacenados en frascos de polietileno de alta densidad.

El pH de todos los sistemas es 5, 0.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0, 91, con excepción de los sistemas 1 y 18 cuya actividad de agua es 1, 00.

Tabla 4.25: Contenido de hierro presente en los sistemas analizados.

Sistema	Contenido de Fe³⁺ (ppm)
agua	< 0,002
agua/KS	0,002
agua/EDTA	0,002
agua/H ₃ PO ₄ #	0,030
agua/KS/EDTA* (sistema 18)	0,300
agua/KS/EDTA*♥ (sistema 18)	0,450
agua/KS* (sistema 1)	0,037
agua/KS*♥ (sistema 1)	0,010

KS : sorbato de potasio.

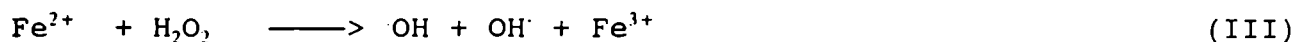
La cantidad de H₃PO₄ adicionada corresponde a la necesaria para ajustar el pH del sistema agua/KS/EDTA a 5,0.

* Los sistemas fueron almacenados a 57 °C durante 42 días.

♥ Los sistemas fueron almacenados en envases de polietileno de alta densidad.

Cabe recordar que el vidrio está compuesto principalmente por dióxido de silicio y cantidades variables de otros óxidos de sodio, calcio, magnesio, hierro etc. Estos óxidos pueden migrar a la solución y actuar como catalizadores o sustrato de distintas reacciones químicas (Avis, 1986). Además, en el caso de emplear polímeros sintéticos como polietileno, el hierro puede estar presente como residuo de los catalizadores empleados en la síntesis (Perry, 1963).

El efecto catalítico del EDTA sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato puede explicarse si se considera que, algunos antioxidantes, actúan como agentes secuestrantes de los metales. Estos suprimen la reactividad del metal, ya sea por precipitación o bien ocupando todos los sitios de coordinación. Sin embargo, la formación de complejos hierro-EDTA no excluye la participación del hierro en el ciclo de Haber Weiss:



El catión hierro (II) reduce al oxígeno a $\text{O}_2^{\cdot -}$, el que espontáneamente se transforma en H_2O_2 y O_2 . La combinación de hierro (II) y H_2O_2 , conocida como "reactivo de Fenton" produce radicales hidroxilo altamente reactivos, que oxidan en forma indiscriminada a la mayor parte de los compuestos presentes en un alimento.

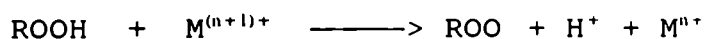
Cabe destacar que la producción de radicales hidroxilo a partir de H_2O_2 requiere que el hierro posea al menos un sitio de coordinación libre. Esta condición la cumplen los complejos hierro (III) - EDTA. Estos poseen siete sitios de coordinación, de los cuales uno es ocupado por el agua, estando disponible para reacciones de oxidoreducción. Esta característica, sumada a la elevada solubilidad de los complejos EDTA-hierro (III) los convierte en eficaces catalizadores de reacciones de oxidación (Mahoney y Graf, 1986).

A título ilustrativo, cabe mencionar que, el complejo hierro (III) - EDTA se emplea como agente blanqueador en el proceso de fabricación de película fotográfica. Además, ha sido usado para la oxidación del ácido benzoico y salicílico a sus respectivos hidroxil derivados (Grinstead, 1960) y para la oxidación del fenol a hidroquinona y pirocatecol (Mahoney y Graf, 1986).

El ion hierro (III) por sí mismo no permite la formación de radicales oxígeno ni promueve la oxidación de lípidos. Es la presencia del ion hierro (II) en solución, la que promueve la formación de estos, a partir de las reacciones involucradas en el ciclo de Haber-Weiss, Además, la presencia del ion hierro (II), también puede iniciar un único ciclo de peroxidación, pero la inclusión de un agente reductor que provea al medio, en forma continua, iones hierro (II) es la que conduce al deterioro oxidativo. Este ciclo de reacciones puede ser iniciado por numerosas sustancias reductoras, entre ellas, ácido ascórbico, α -tocoferol, dopamina, catecoles, glutatión reducido.

En presencia de sorbato, distintas reacciones pueden promover la reducción de hierro (III) a hierro (II). Arya (1980) postuló que los iones de metales pesados, en especial aquellos que poseen dos o más estados de oxidación, con un satisfactorio potencial redox entre ellos, generalmente aceleran la velocidad de autooxidación. Las siguientes reacciones ejemplifican el mecanismo involucrado:

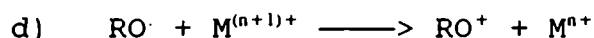
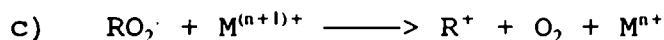
a) Descomposición de hidroperóxidos en radicales libres:



b) Participación en reacciones de iniciación:



Arya también indicó que, bajo determinadas condiciones, los iones de metales pesados pueden disminuir la velocidad de la reacción de autooxidación, debido a la destrucción de radicales libres a través de las siguientes reacciones:



En base a lo mencionado, el alto contenido de hierro hallado en presencia de EDTA, podría ser la causa del incremento de la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato cuando se adiciona este aditivo. Las reacciones a) a d) podrían reducir el hierro (III) extraído del material de empaque (vidrio o polietileno) mediante la complejación con EDTA, a hierro (II). Este ion podría iniciar el ciclo de Haber-Weiss y catalizar la degradación del ácido sórbico.

4.4.9.1.2 - Pardeamiento no enzimático

La Figura 4.31 ilustra el efecto de la adición de EDTA (500 ppm) sobre el incremento de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo de almacenamiento a 33, 45 y 57 °C para el sistema formado por agua, sorbato de potasio, NaCl y glicerol. En ella se observa que, la presencia de EDTA produjo un aumento significativo en la velocidad de pardeamiento.

En la Tabla 4.26 se detallan los parámetros cinéticos de la reacción de pardeamiento no enzimático en presencia de EDTA. En ella se aprecia que, en todos los casos, la adición de este aditivo incrementó la velocidad de la reacción. Este efecto es el esperado ya que, la adición de EDTA al acelerar la destrucción de los sorbatos, aceleraría la formación de pigmentos pardos debido a la polimerización de los compuestos carbonílicos formados.

A fin de visualizar la magnitud del efecto acelerante del EDTA sobre el desarrollo de pardeamiento, se calculó el tiempo y el porcentaje de destrucción de sorbato de potasio necesario para alcanzar una absorbancia a 420 nm de 0,1. Ello se muestra en la Tabla 4.27. Los resultados obtenidos indican que la presencia conjunta de sorbato y EDTA puede disminuir la vida útil de un alimento, ya que acelera la destrucción del preservador y el desarrollo de pardeamiento. Estos resultados destacan la importancia de considerar todas las interacciones posibles entre los distintos aditivos cuando se formula un producto.

Figura 4.31: Efecto de la adición de EDTA sobre el incremento de la absorbancia a 420 nm en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema sin EDTA (4) □ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema con EDTA (14) ■ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

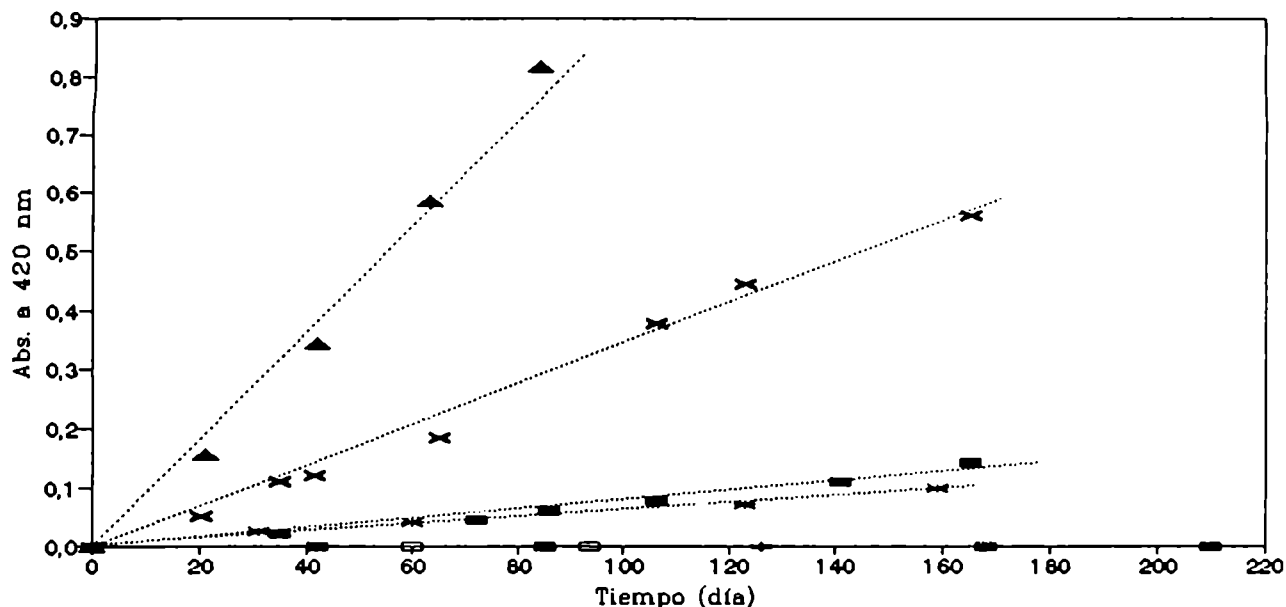


Tabla 4.26 : Constantes de velocidad de la reacción de pardeamiento no enzimático en presencia de EDTA.

Sistema	Temperatura (° C)	(k ± d)10 ³ (abs./día)
1 (agua/KS)	57	4,1 ± 0,1 a
18 (agua/KS/EDTA) 500 PPM	57	12,8 ± 0,7 a
4 (agua/KS/NaCl/glicerol)	57	0,6 ± 0,1 bcde
15 (agua/KS/NaCl/glicerol) EDTA 100 ppm	57	9,5 ± 0,1 b
16 (agua/KS/NaCl/glicerol) EDTA 250 ppm	57	8,9 ± 0,1 c
14 (agua/KS/NaCl/glicerol) EDTA 500 ppm	57	9,8 ± 0,5 d
17 (agua/KS/NaCl/glicerol) EDTA 1000 ppm	57	9,3 ± 0,3 e

KS: sorbato de potasio; d: desviación estándar.

Las constantes de velocidad (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95)

El pH de todos los sistemas es 5,0.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0,91, con excepción de los sistemas 1 y 18 cuya actividad de agua es 1,00.

Tabla 4.27: Tiempo y porcentaje de destrucción de sorbato de potasio necesarios para alcanzar una absorbancia a 420 nm de 0.1.

Sistema	Temp. (°C)	Tiempo (día)	Destrucción de KS (%)
agua/KS/NaCl/ glicerol	33	N.R.P	N.R.D
	45	N.R.P	N.R.D
	57	164	20
agua/KS/NaCl/ glicerol/EDTA	33	126	29
	45	33	16
	57	13	15

KS: sorbato de potasio.

N.R.P: no se registró pardeamiento a lo largo de un almacenamiento de 200 días.

N.R.D: no se registró destrucción a lo largo de un almacenamiento de 200 días.

4.4.4.9.2 - Influencia del propilgalato sobre la estabilidad

El propilgalato es un antioxidante que actúa combinándose con los radicales libres para formar especies menos reactivas y, por lo tanto, disminuye la velocidad de las reacciones de oxidación. A diferencia de otros antioxidantes fenólicos, tiene la ventaja de ser relativamente soluble en agua (Cheftel y Cheftel, 1976).

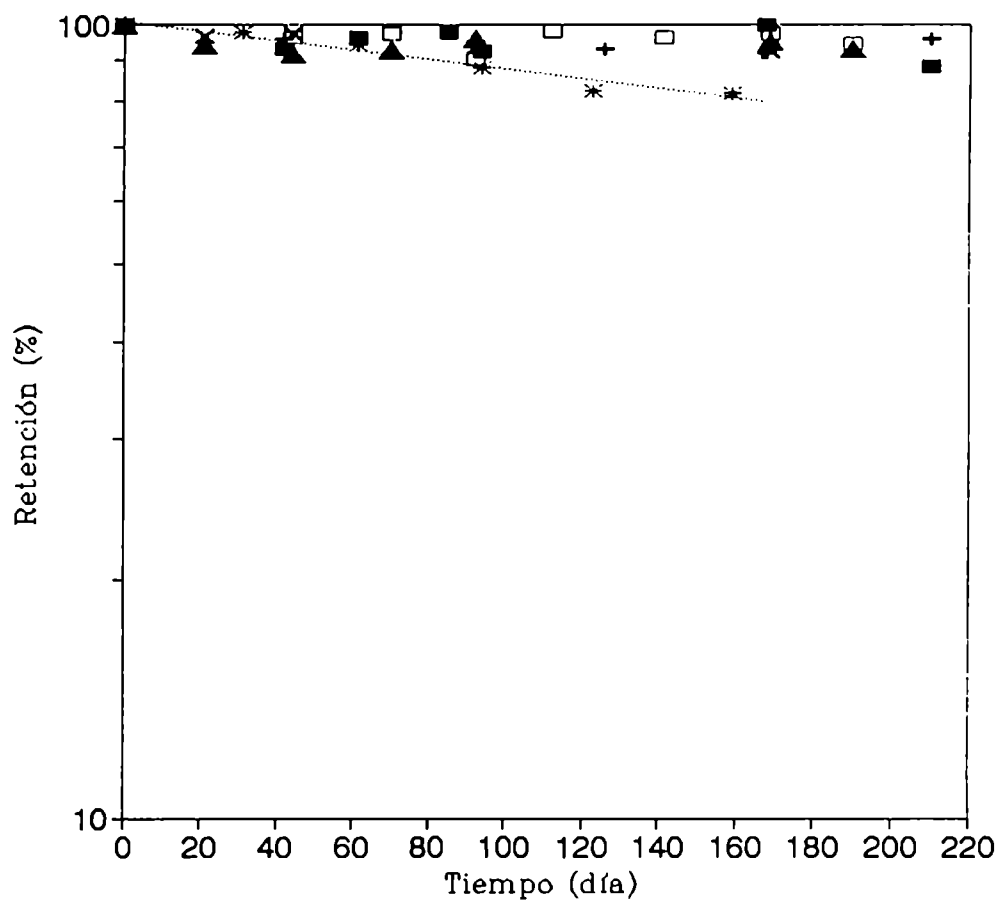
En la Figura 4.32 se muestra el efecto de la adición de propilgalato sobre el porcentaje de retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento a 33, 45 y 57 °C en presencia de NaCl y glicerol (sistema 19, Tabla 4.4). Como ya se comentó, en ausencia de propilgalato (sistema 4, Tabla 4.3), la retención de sorbato disminuyó con el tiempo de almacenamiento únicamente a 57 °C; paralelamente también se incrementó la absorbancia a 420 nm. En presencia de propilgalato no se observaron pérdidas a ninguna de las temperaturas estudiadas al cabo de 200 días y tampoco se registró un aumento de la absorbancia a 420 nm. Por lo tanto, se concluye que el propilgalato disminuye la degradación del sorbato y, por ende, la formación de compuestos pardos. Estos resultados están en concordancia con los informados por otros investigadores (Hildegard y Sabalitschka, 1965; Pekkarinen y Soimakallio, 1968; Arya, 1980; Arya y Thakur, 1988).

Pekkarinen y Soimakallio (1968) estudiaron el efecto de la adición de diferentes concentraciones de propilgalato ($4,7 \cdot 10^{-6}$ M a $4,7 \cdot 10^{-4}$ M) sobre la velocidad de oxidación del ácido sórbico en soluciones acuosas de ácido sulfúrico 0,04 N y reportaron que, a medida que se incrementaba la concentración de propilgalato, se observaba una menor velocidad de destrucción del preservador.

Figura 4.32: Efecto de la adición de propilgalato sobre el porcentaje de retención de sorbato de potasio en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema sin propilgalato (4) ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema con propilgalato (19) □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C



Dado que la degradación del ácido sórbico ocurre a través de un mecanismo en cadena, que comienza con la formación de un diradical (Pekkarinen, 1969), probablemente, el propilgalato interrumpa la cadena de radicales libres actuando de igual forma que frente a un ácido graso.

4.4.9.3 - Influencia de los polifosfatos

Los polifosfatos se adicionan a los productos cárnicos, principalmente para aumentar la capacidad de retención de agua. Además actúan como antioxidantes. Los polifosfatos y, en particular, el tripolifosfato de sodio, mejoran el color, el aroma y la terniza de la carne (Smith y col., 1984).

4.4.9.3.1 - Degradación del sorbato

En la Figura 4.33 se muestra el efecto de la adición de polifosfatos sobre la retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento a 33, 45 y 57 °C, en presencia NaCl y glicerol. Como se puede observar, no se detectaron pérdidas de sorbato ni siquiera a 57°C, en presencia de polifosfatos. Por lo que se deduce que, los polifosfatos ejercen una acción protectora.

Dado que los polifosfatos son un componente usualmente empleado en la elaboración de embutidos cárnicos, se estudió su influencia en la degradación de los sorbatos, en presencia de glicina y de otros aditivos característicos (nitrito de sodio, sacarosa y ácido ascórbico) y se analizaron todas las combinaciones polifosfato/aditivo con el objetivo de establecer el efecto de éstas sobre la degradación del sorbato.

En la Tabla 4.28 se muestra el efecto de los polifosfatos sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato a 57 °C. En ella se aprecia que, en todos los sistemas estudiados, los polifosfatos disminuyeron la degradación del sorbato. Este efecto fue más acentuado cuando el nitrito de sodio era un componente del sistema y en el sistema 27, el cual contenía sacarosa además de polifosfatos.

Shahidi y col. (1986) estudiaron el efecto de distintos agentes complejantes sobre las reacciones de oxidación de lípidos en carnes cocidas, reportando que, en general, los fosfatos tienen un efecto antioxidante sobre la carne cocida y que, el fosfato monosódico y disódico son menos efectivos que el tripolifosfato de sodio.

Watts (1950) postuló que el efecto antioxidante de los polifosfatos se debería a su capacidad de complejar metales pesados, en particular hierro, cuya presencia acelera la oxidación de lípidos.

Figura 4.33: Efecto de la adición de polifosfatos sobre el porcentaje de retención de sorbato de potasio en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema sin polifosfatos (4) ■ 33 C; + 45 C; * 57 C

Sistema con polifosfatos (20) □ 33 C; x 45 C; ▲ 57 C

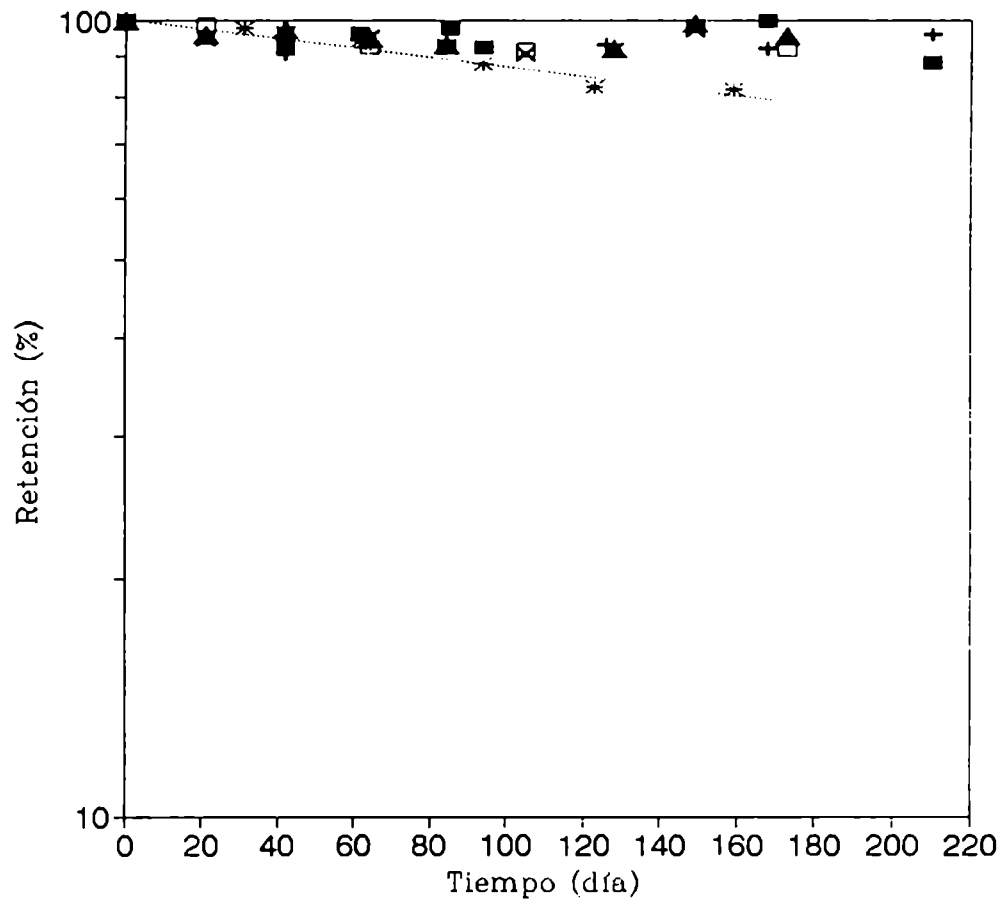


Tabla 4.28: Efecto de los polifosfatos sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato a 57 °C en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Nº de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10 ³ (día ⁻¹)
4 - (----)	1,4 ± 0,1
20 - (PP)	N.R.D
11 - (gly)	13,4 ± 0,4 a
26 - (gly/PP)	10,0 ± 0,5 a
24 - (gly/S)	25,9 ± 1,5 b
27 - (gly/S/PP)	9,9 ± 0,6 b
25 - (gly/AA)	15,2 ± 0,6 c
29 - (gly/AA/PP)	12,1 ± 0,7 c
28 - (gly/AA/S)	18,9 ± 0,6 d
30 - (gly/AA/S/PP)	13,7 ± 1,3 d
31 - (gly/N)	22,2 ± 0,6 e
36 - (gly/N/PP)	7,1 ± 0,4 e
35 - (gly/N/AA)	14,1 ± 0,8 f
38 - (gly/N/AA/PP)	5,8 ± 0,4 f
34 - (gly/N/S)	22,3 ± 0,6 g
39 - (gly/N/S/PP)	8,3 ± 0,4 g
37 - (gly/N/S/AA)	16,5 ± 0,6 h
40 - (gly/N/S/AA/PP)	6,3 ± 0,2 h

PP: polifosfatos; gly: glicina; S: sacarosa; AA: ácido ascórbico; N: nitrito de sodio.

d : desviación estándar.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P:0,95).

N.R.D: no se registró destrucción.

4.4.9.3.2 - Pardeamiento no enzimático

En la Tabla 4.29 se muestra el efecto de los polifosfatos sobre la velocidad de la reacción de pardeamiento a 57 °C. En ella se aprecia que en todos los sistemas estudiados, los polifosfatos disminuyeron el desarrollo de pigmentos pardos. Este efecto puede ser explicado si se considera que, la adición de polifosfatos disminuye la velocidad de destrucción del sorbato. En consecuencia, hay una menor producción de grupos carbonílicos que puedan polimerizarse o reaccionar con glicina, vía reacción de Maillard, conduciendo a la formación de pigmentos pardos.

4.4.9.4 - Influencia del ácido ascórbico

El ácido ascórbico se agrega a las carnes por que actúa como un coadyuvante del enrojecimiento, uniforma el color y bloquea la formación de nitrosaminas en carnes curadas (Izumi, 1992). Sin embargo, puede acelerar la oxidación de lípidos si el contenido de tocoferol es bajo o si no se adicionan otros antioxidantes. Algunos autores afirman que cuando se hallan presentes complejantes de metales, el ácido ascórbico inhibe la oxidación de lípidos (Liao y Seib, 1988).

4.4.9.4.1 - Degradación de sorbato

En la Figura 4.34 se muestra el efecto del ácido ascórbico sobre la retención del sorbato de potasio en presencia de la mezcla de humectantes utilizada (sistema 22). Como se puede observar, no se detectaron pérdidas en el contenido de sorbato a 33 y 45 °C. Sin embargo, a 57 °C, la velocidad de destrucción fue mayor cuando el ácido ascórbico estaba presente.

Considerando que el ácido ascórbico, usualmente, se adiciona a sistemas cárnicos en presencia de otros aditivos, se analizó el efecto de la presencia conjunta de éste con glicina, nitrito de sodio, sacarosa y polifosfatos sobre la destrucción del sorbato a 57 °C (sistemas 25, 28, 29, 30, 35, 37, 38, 40).

Como se muestra en la Tabla 4.30, el ácido ascórbico presentó un comportamiento dual. En ausencia de nitrito de sodio, en general, ejerció un efecto prooxidante; pero cuando había nitrito de sodio en el sistema, el ácido ascórbico presentó un efecto protector.

Tabla 4.29: Efecto de los polifosfatos sobre la velocidad de reacción de pardeamiento a 57 °C en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Nº de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10³ (día⁻¹)
4 - (-----)	0,6 ± 0,1
20 - (PP)	N.R.P
11 - (gly)	21,4 ± 1,0 a
26 - (gly/PP)	8,2 ± 0,5 a
24 - (gly/S)	32,1 ± 2,0 b
27 - (gly/S/PP)	7,3 ± 0,2 b 33,6 ± 1,8 (1)
25 - (gly/AA)	34,7 ± 2,8 c
29 - (gly/AA/PP)	27,4 ± 1,3 c
28 - (gly/AA/S)	31,5 ± 1,4 d
30 - (gly/AA/S/PP)	26,4 ± 1,2 d

PP: polisfosfatos; gly: glicina; S: sacarosa; AA: ácido ascórbico.
d : desviación estándar.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P:0,95).

(1) Constante de velocidad después de 28 días de almacenamiento.

N.R.P: no se registró pardeamiento.

Figura 4.34: Efecto de la adición de ácido ascórbico sobre el porcentaje de retención de sorbato de potasio en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema sin ácido ascórbico (4) ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C
 Sistema con ácido ascórbico (22) □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

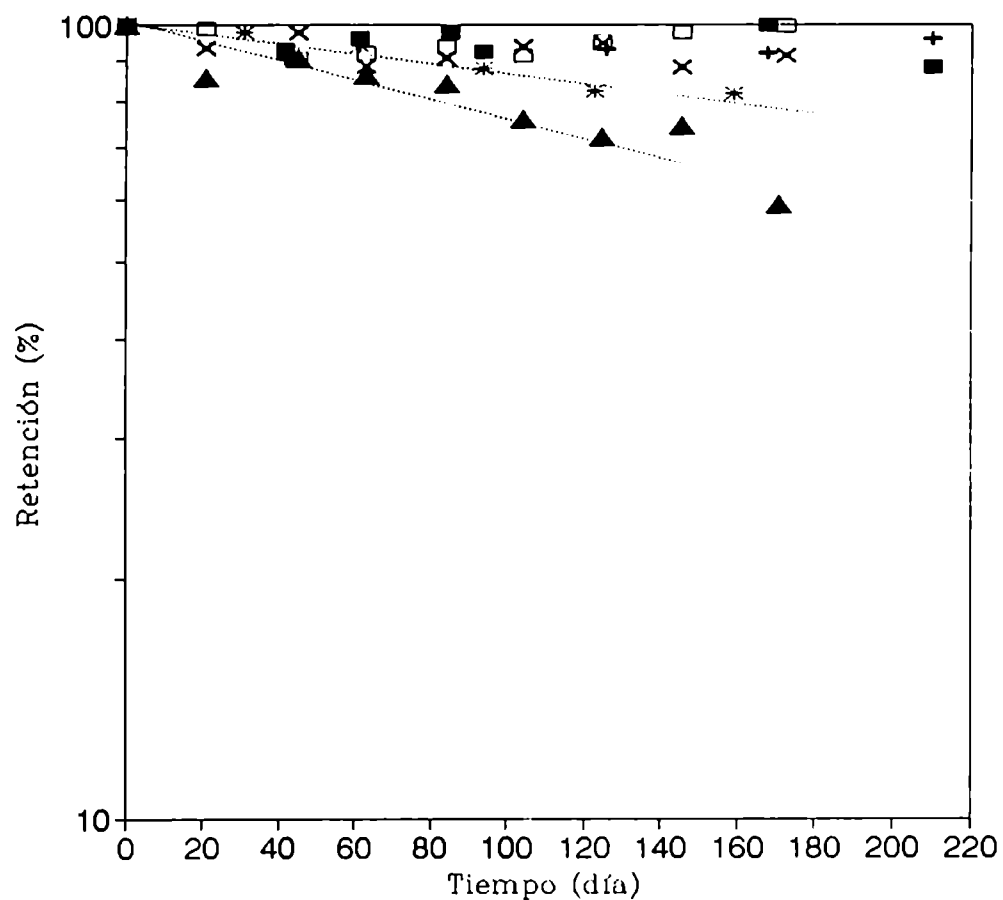


Tabla 4.30: Efecto del ácido ascórbico sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato a 57 °C, en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Nº de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10³ (día⁻¹)	
4 - (-----)	1,4 ± 0,1	a
22 - (AA)	3,1 ± 0,2	a
11 - (gly)	13,4 ± 0,4	b
25 - (gly/AA)	15,2 ± 0,6	b
24 - (gly/S)	25,9 ± 1,5	c
28 - (gly/S/AA)	18,9 ± 0,6	c
26 - (gly/PP)	10,0 ± 0,5	d
29 - (gly/PP/AA)	12,1 ± 0,7	d
27 - (gly/PP/S)	9,9 ± 0,6	e
30 - (gly/PP/S/AA)	13,7 ± 1,3	e
31 - (gly/N)	22,2 ± 0,6	f
35 - (gly/N/AA)	14,1 ± 0,8	f
34 - (gly/N/S)	22,3 ± 0,6	g
37 - (gly/N/S/AA)	16,5 ± 0,6	g
36 - (gly/N/PP)	7,1 ± 0,4	h
38 - (gly/N/PP/AA)	5,8 ± 0,4	h
39 - (gly/N/S/PP)	8,3 ± 0,4	i
40 - (gly/N/S/PP/AA)	6,3 ± 0,2	i

AA: ácido ascórbico; gly: glicina; S: sacarosa; PP: polifosfatos;

N: nitrito de sodio.

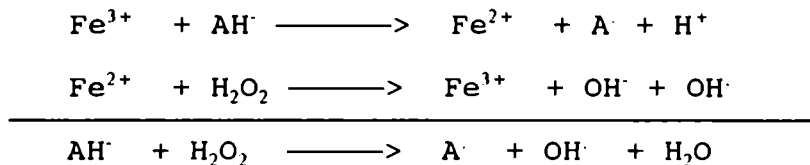
d: desviación estándar.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

Pekkarinen (1969, b) estudió el efecto de las sales metálicas en presencia de ácido ascórbico (0,005 M) sobre la degradación del ácido sórbico en soluciones acuosas que contenían ácido cítrico (1g/100 ml). Este autor reportó que cuando la concentración de hierro (III) era aproximadamente de 10^{-5} mol/l, la velocidad de la reacción se aceleraba en forma notable, mientras que concentraciones del orden de 10^{-3} mol/l producían un retardo. En ausencia de hierro (III), el ácido ascórbico no influía en forma apreciable sobre la velocidad de reacción. Resultados análogos fueron obtenidos empleando cobre (II) en lugar de hierro (III). En base a lo mencionado, Pekkarinen concluyó que el ácido ascórbico, en cierta concentración, en presencia de sales metálicas, actúa como prooxidante.

El efecto prooxidante del ácido ascórbico estaría asociado a la capacidad de reducir el estado de oxidación de un metal de transición (Liao y Seib, 1988; Mahoney y Graf, 1986).

A pesar de parecer contradictorio que un agente reductor como el ácido ascórbico actúe como acelerador de reacciones de deterioro oxidativas como por ejemplo, la pérdida de flavor o color por la oxidación de carotenos, esta acción se debería al hecho de que el ácido ascórbico puede participar en una reacción tipo Fenton, que se esquematiza a continuación:



donde : AH^- = ion l-ascorbato
 A^\cdot = radical libre del l-ascorbato

El ácido ascórbico reduce así al hierro (III) a hierro (II), el cual reacciona con agua oxigenada, formándose radicales hidroxilo que actúan blanqueando pigmentos y propagando reacciones en cadena, a través de radicales libres.

El efecto prooxidante del ácido ascórbico no se manifestaría si su concentración en el alimento fuese suficiente para captar a los radicales formados a través de la reacción de Fenton (Liao y Seib, 1988).

Con el objetivo de establecer si el efecto prooxidante del ácido ascórbico era causado por la presencia de cationes metálicos, se investigó la presencia de hierro (III). Los resultados indicaron que la solución acuosa de sorbato de potasio conteniendo NaCl, glicerol, glicina y ácido ascórbico (sistema 25) inicialmente contenía 0,160 ppm de hierro (III). A los 42 días de almacenamiento a 57 °C, se midieron 0,300 ppm de hierro (III). Tanto la concentración inicial como la

hallada a los 42 días de almacenamiento, son menores a 10^{-5} mol/l, es decir que corresponden al tenor de hierro (III) indicado por Pekkarinen para ejercer un efecto prooxidante, en presencia de ácido ascórbico.

El incremento en la concentración de hierro (III) conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, puede ser explicado si se considera la posibilidad de que el hierro (III) sea extraído del envase de vidrio, como se mencionó previamente, al analizar el efecto del EDTA (Avis, 1985).

Otra explicación para la acción prooxidante observada es la propuesta por Fodor y col. (1983). Ellos postularon que el ácido ascórbico puede participar en reacciones de adición con compuestos carbonílicos α, β no saturados, como la acroleína que es un producto de la degradación de los sorbatos. Si esta reacción hubiese ocurrido en los sistemas analizados, consumiendo productos de la oxidación del sorbato, podría haberse acelerado la velocidad global de la reacción estudiada.

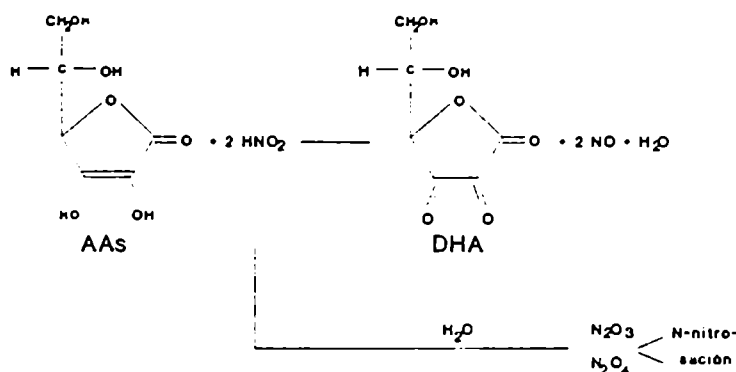
En base a lo comentado, se concluye que el efecto acelerante del ácido ascórbico sobre la destrucción del sorbato se debería a que, habiendo trazas de hierro (III) en el medio, el ascórbico actuaría como prooxidante, ya que a través de un reacción tipo Fenton se formarían radicales hidroxilo que acelerarían la etapa de propagación de la reacción de autoxidación del sorbato. Además, si ocurriesen reacciones de adición entre el ácido ascórbico y los productos de destrucción del sorbato, también se aceleraría la velocidad de destrucción de este último.

Cabe destacar que en el caso del sistema 24 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol, glicina y sacarosa), la adición de ácido ascórbico (sistema 28), no produjo el efecto prooxidante antes mencionado, sino por el contrario se manifestó un efecto protector. Este hecho, contrapuesto a la tendencia general, podría ser ocasionado por la interacción entre el ácido ascórbico, la sacarosa y/o los productos de hidrólisis de ésta. Wedzicha (1984) reportó que la 3-deoxipentosulosa (DP) y la 3,4-dideoxipentosulosa (DDP) son intermediarios en el desarrollo de pardeamiento tanto del ácido ascórbico como de las pentosas, como por ejemplo fructosa. Este mecanismo químico similar, en cuanto al pardeamiento, sugiere la posibilidad de la interacción de la fructosa (producto de la hidrólisis de la sacarosa) con el ácido ascórbico. Ello podría ser la razón de la tendencia observada.

En presencia de nitrito de sodio, el ácido ascórbico protege al sorbato de su degradación (Tabla 4.30). La razón de este comportamiento diferencial del ácido ascórbico, en presencia o ausencia de nitrito de sodio, puede explicarse tomando en consideración lo siguiente :

* En diferentes estudios (Namiki y Kada, 1975; Namiki y col., 1981) se ha reportado que el ácido sórbico y el nitrito de sodio pueden reaccionar formando diferentes compuestos con actividad genotóxica sobre las bacterias (este punto ha sido analizado en la sección 1.2.2.2.d). En el caso de que esta reacción ocurriese en las condiciones de este trabajo, se esperaría una mayor velocidad de degradación del sorbato en presencia de nitrito.

* Cuando se adiciona ácido ascórbico en presencia de nitrito de sodio, según diferentes autores (Kyrtopoulus, 1987; Izumi, 1992) ocurre la siguiente reacción:



En la reacción se reducen dos moles de ácido nitroso a óxido de nitrógeno (II) por cada mol de ácido ascórbico, el cual se oxida a ácido dehidro-ascórbico. Esta reacción permite disminuir la formación de nitrosaminas en carnes curadas. Se ha reportado que, empleando un exceso de ácido ascórbico en relación al nitrito, se logra la completa inhibición *in vitro* de la nitración de distintas aminas (Mirvish y col. 1972). En el caso de los sistemas analizados, éstos contenían 0,008 % (m/m) de nitrito de sodio y 0,050 % (m/m) de ácido ascórbico. Esto implica que, según la estequiometría de la reacción, el ácido ascórbico era el reactivo en exceso; por lo tanto, el nitrito se debería haber consumido completamente. Como consecuencia, la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito debería haber sido mínima o bien no ocurrir, produciéndose una menor velocidad de destrucción del sorbato. Además, debido a la reacción entre el nitrito y el ácido ascórbico, la cantidad de ácido ascórbico disponible para participar en reacciones de adición con compuestos carbonílicos α, β -no saturados habría sido menor y su influencia sobre la velocidad global de destrucción del sorbato se habría visto minimizada.

4.4.9.4.2 - Pardeamiento no enzimático

En la Tabla 4.31 se muestra el efecto del ácido ascórbico sobre la velocidad de la reacción de pardeamiento a 57 C. En ella se aprecia que, en general, el ácido ascórbico aceleró la formación de pigmentos pardos.

Tabla 4.31: Efecto del ácido ascórbico sobre la velocidad de la reacción de pardeamiento a 57 °C, en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Nº de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10 ³ (día ⁻¹)
4 - (-----)	0,6 ± 0,1 a
22 - (AA)	3,8 ± 0,2 a
11 - (gly)	21,4 ± 1,0 b
25 - (gly/AA)	34,7 ± 2,8 b
24 - (gly/S)	32,1 ± 2,0
28 - (gly/S/AA)	31,5 ± 1,4
26 - (gly/PP)	8,2 ± 0,5 c
29 - (gly/PP/AA)	27,4 ± 1,3 c
27 - (gly/PP/S)	7,3 ± 0,2 d 33,6 ± 1,8 (1)
30 - (gly/PP/S/AA)	26,4 ± 1,2 d

AA: ácido ascórbico; gly: glicina; S: sacarosa; PP: polifosfatos;

N: nitrito de sodio.

d: desviación estándar.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

(1) constante de velocidad después de 28 días de almacenamiento.

En la Figura 4.35, se observa que, en presencia de polifosfatos y sacarosa (sistema 27) la velocidad de pardeamiento no fue constante, distinguiéndose dos etapas, la primera de ellas, más lenta y la segunda más rápida. Cuando se adicionó ácido ascórbico (sistema 30), se aceleró la velocidad global de pardeamiento ya que desapareció la etapa de la reacción que ocurre a menor velocidad. En consecuencia, el tiempo necesario para la formación de color amarillento (equivalente a una absorbancia de 0,1 a 420 nm), disminuyó de 14 a 3 días cuando se agregó ácido ascórbico.

El incremento de la velocidad de pardeamiento puede ser ocasionado por dos factores diferentes:

a) La presencia de ácido ascórbico acelera la destrucción del sorbato, elevándose la concentración de compuestos carbonílicos que pueden polimerizarse o bien, en presencia de glicina, originar pigmentos pardos vía reacción de Maillard.

b) El ácido ascórbico es, en sí mismo un compuesto que se oxida y da origen a reacciones de pardeamiento (Braverman, 1967; Buera y col., 1987). En la sección 4.4.10 se mostrará que, si bien la oxidación del ácido ascórbico contribuyó al desarrollo de pardeamiento, los productos de la degradación del sorbato fueron la causa mayoritaria del mismo.

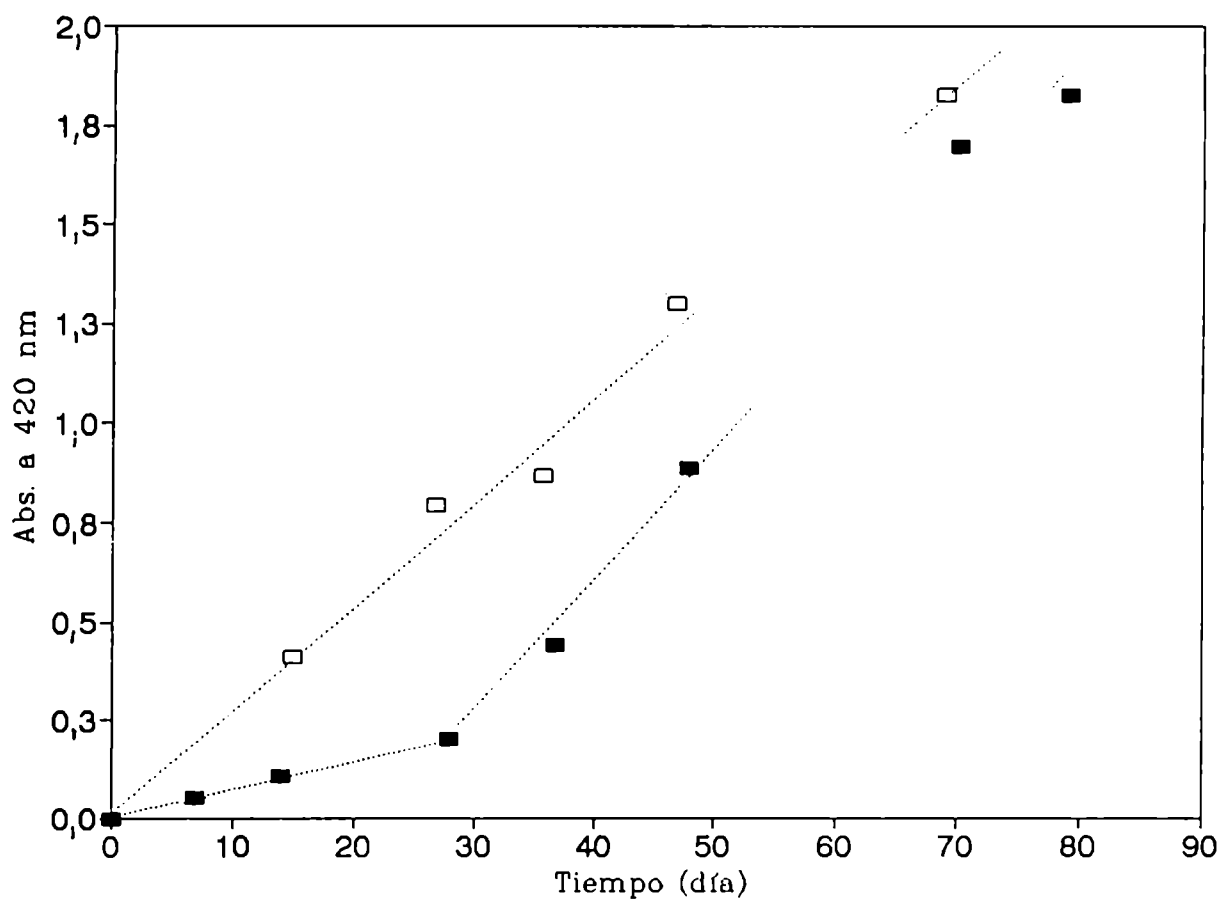
Cabe destacar que, en el sistema acuoso conteniendo sorbato de potasio, NaCl, glicerol, glicina y sacarosa (sistema 24), la adición de ácido ascórbico (sistema 28) no afectó en forma significativa la velocidad de pardeamiento. Recordemos que, en este sistema, la adición de ácido ascórbico no evidenció un efecto prooxidante, sino por el contrario ejerció una acción protectora. Probablemente, como resultado de la interacción entre el ácido ascórbico, la sacarosa y sus productos de hidrólisis, la velocidad de pardeamiento no se vio afectada.

4.4.9.5 - Influencia del nitrito de sodio sobre la estabilidad

El nitrito se ha usado en la preservación de los productos cárnicos durante siglos, sus funciones son múltiples: imparte el color y flavor característico de las carnes curadas, actúa como antioxidante y provee protección contra el crecimiento del *C. botulinum* y la producción de su toxina (Pierson y Smoot, 1982). Todas estas propiedades lo convierten en un aditivo difícil de ser reemplazado. Sin embargo, el nitrito, presenta el inconveniente de combinarse con las aminas presentes en la carne y formar nitrosaminas que son carcinogénicas. Por esta razón, se ha tratado de sustituirlo parcialmente por otro agente antimicrobiano. Diferentes estudios han sugerido que el uso combinado de nitrito de sodio y sorbato de potasio asegura la estabilidad microbiológica de los productos cárnicos (Ivey y Robach, 1978; Pierson y col., 1980; Sofos y Busta, 1980).

Figura 4.35: Efecto de la adición de ácido ascórbico sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático a 57 °C en presencia de NaCl, glicerol, glicina, sacarosa y polifosfatos a pH 5,0.

■ sin ácido ascórbico; □ con ácido ascórbico



En esta sección se analizará el efecto del nitrito de sodio sobre la estabilidad de los sorbatos, en presencia de los distintos aditivos que normalmente se emplean en la preparación de carnes curadas.

En las Figuras 4.36 y 4.37 se muestra el efecto de la presencia de nitrito de sodio en la degradación del sorbato de potasio en sistemas conteniendo NaCl y glicerol (sistema 23) o NaCl, glicerol y glicina (sistema 31).

En la Figura 4.36 se observa que, en ausencia de glicina, no se registraron pérdidas en el contenido de sorbato al cabo de 140 días de almacenamiento a 33, 45 y 57 °C en presencia de nitrito de sodio. Por el contrario, en el sistema sin nitrito de sodio, a 57 °C el sorbato se destruyó a lo largo del almacenamiento. Esto indica que, en ausencia de glicina, el nitrito de sodio ejercería un efecto protector sobre la degradación del sorbato.

En la Figura 4.37 se observa que, cuando hay glicina, el nitrito de sodio acelera significativamente la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato.

En la Tabla 4.32 se reportan los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato de potasio en sistemas conteniendo NaCl, glicerol y glicina. En ella se observa que la sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura no se modificó por el agregado de nitrito, ya que las energías de activación de los sistemas 11 y 31 no mostraron diferencias significativas.

Con el objetivo de establecer si la concentración de nitrito presente afectaba la velocidad de destrucción del sorbato a 57 °C, se analizó el efecto de la adición de 40 y 120 ppm del mismo (sistemas 32 y 33). Los resultados obtenidos indicaron que la destrucción era independiente de la concentración de nitrito de sodio.

En la Tabla 4.33 se muestra el efecto del nitrito de sodio sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio en presencia de los distintos aditivos analizados. En ella se observa que el efecto del nitrito sobre la destrucción del sorbato fue diverso :

* En presencia de ácido ascórbico, ejerció un efecto protector, con excepción del sistema 25 en el cual la adición de nitrito no influenció en forma significativa la velocidad de reacción.

* En ausencia de ácido ascórbico se observaron diferentes tendencias. Por ejemplo, el nitrito disminuyó la velocidad de destrucción en ausencia de glicina (sistema 23) o en presencia de polifosfatos y glicina (sistema 36). En presencia de sacarosa y glicina (sistema 34) o de sacarosa, glicina y polifosfatos (sistema 39), no tuvo efecto. En presencia de glicina únicamente (sistema 31), el nitrito aceleró la destrucción.

Figura 4.36: Efecto de la adición de nitrito de sodio (80 ppm) sobre la retención de sorbato de potasio en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema sin nitrito de sodio (4) ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C

Sistema con nitrito de sodio (23) □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

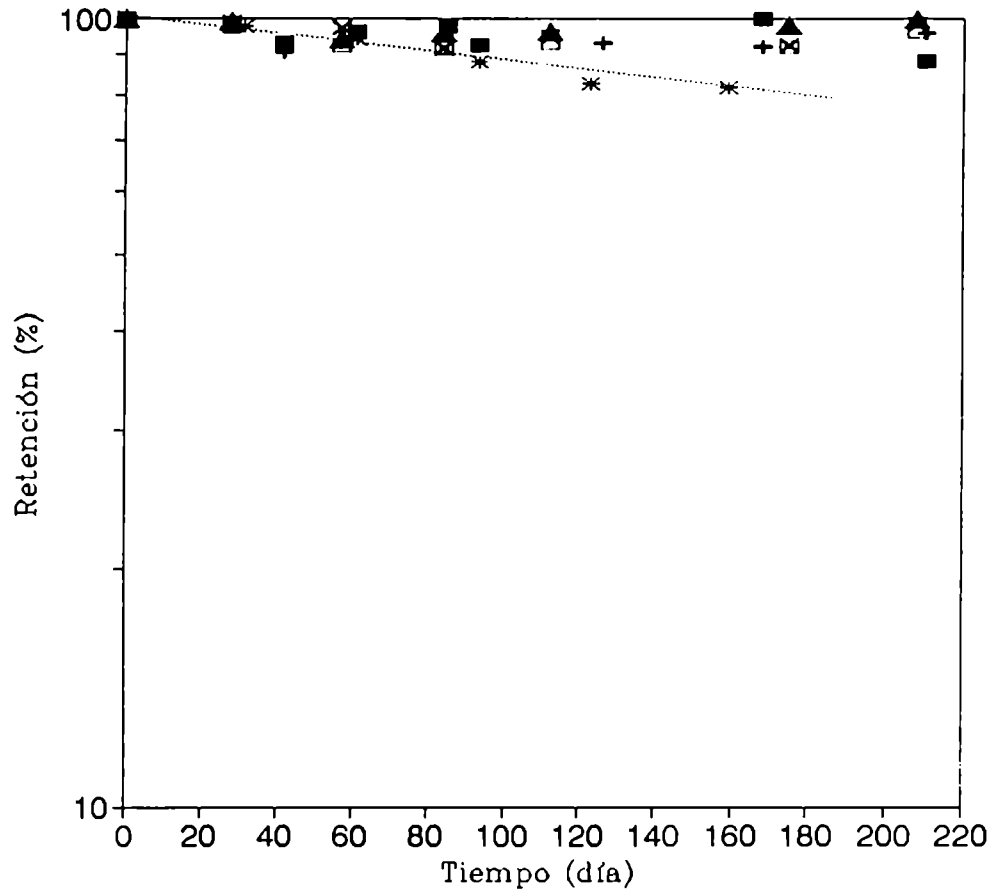


Figura 4.37: Efecto de la adición de nitrito de sodio (80 ppm) sobre la retención de sorbato de potasio en presencia de NaCl, glicerol y glicina a pH 5,0.

Sistema sin nitrito de sodio (11) ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C
 Sistema con nitrito de sodio (31) □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

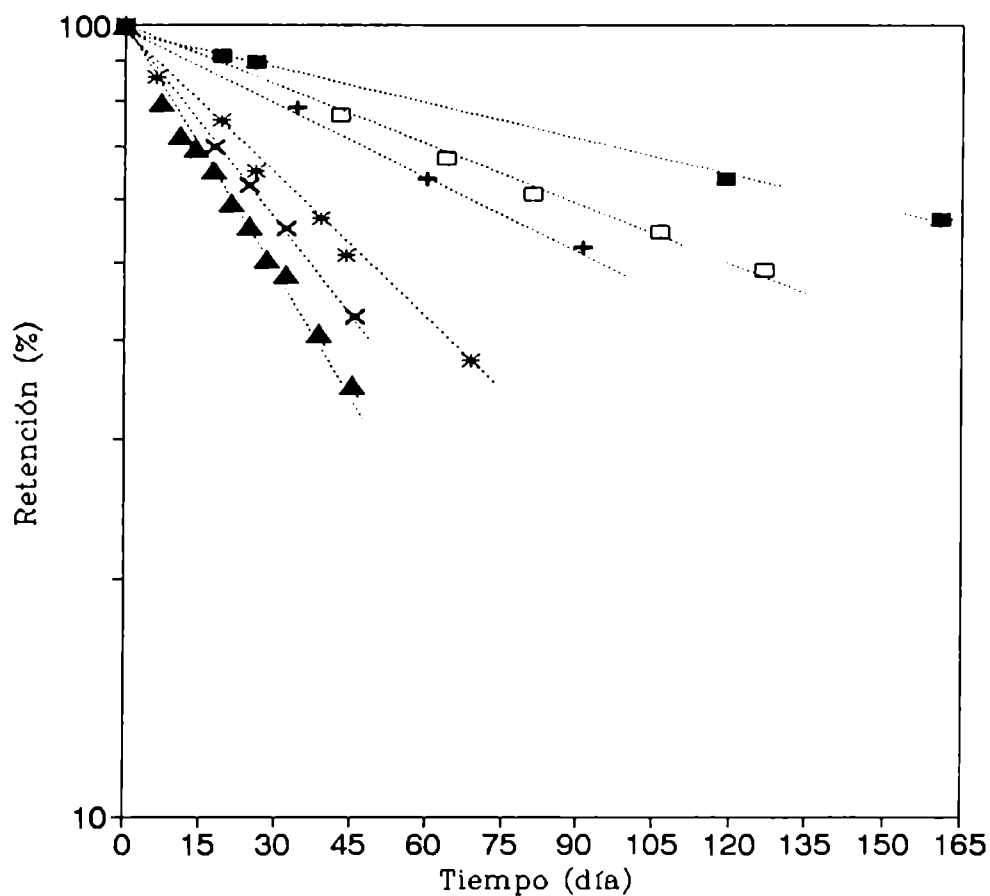


Tabla 4.32: Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato de potasio en presencia de NaCl, glicerol y glicina.

Sistema - (Otros componentes)	Temp (° C)	$(k \pm d) \cdot 10^3 \text{ (día)}^{-1}$	E act (Kcal/mol)
11 - (----)	33	$3.5 \pm 0.1 \text{ a}$	$10 \pm 1 \text{ a}$
	45	$7.2 \pm 0.2 \text{ b}$	
	57	$13.4 \pm 0.4 \text{ cde}$	
31 - (N ^o)	33	$5.6 \pm 0.2 \text{ a}$	12 ± 2
	45	$18.4 \pm 0.3 \text{ b}$	
	57	$22.2 \pm 0.6 \text{ c}$	
32 - (N, 40 ppm)	57	$23.7 \pm 1.2 \text{ df}$	
33 - (N, 120 ppm)	57	$23.9 \pm 0.9 \text{ eg}$	
24 - (N ^o /S/AA/PP)	33	$0.80 \pm 0.1 \text{ a}$	$17 \pm 3 \text{ a}$
	45	$2.3 \pm 0.2 \text{ b}$	
	57	$6.3 \pm 0.2 \text{ cfg}$	

N^o: nitrito de sodio, 80 ppm; S: sacarosa; AA: ácido ascórbico; PP: polifosfatos.
 Las constantes de velocidad (k) o las energías de activación (Ea) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0, 95)
 Las constantes de velocidad (k) varían significativamente con la temperatura para cada sistema; por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.
 El pH de todos los sistemas es 5, 0.
 La actividad de agua de todos los sistemas es 0, 91.

Tabla 4.33: Efecto del nitrito de sodio sobre la velocidad de reacción de destrucción del sorbato de potasio a 57 °C en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Nº de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10³ (día⁻¹)
4 - (-----)	1,4 ± 0,1
23 - (N)	N.R.D
11 - (gly)	13,4 ± 0,4 a
31 - (gly/N)	22,2 ± 0,6 a
24 - (gly/S)	25,9 ± 1,5
34 - (gly/S/N)	22,3 ± 0,6
25 - (gly/AA)	15,1 ± 0,6
35 - (gly/AA/N)	14,1 ± 0,8
29 - (gly/PP)	10,0 ± 0,5 b
36 - (gly/PP/N)	7,1 ± 0,4 b
28 - (gly/S/AA)	18,9 ± 0,6 c
37 - (gly/S/AA/N)	16,5 ± 0,6 c
29 - (gly/AA/PP)	12,1 ± 0,7 d
38 - (gly/AA/PP/N)	5,8 ± 0,4 d
27 - (gly/PP/S)	9,9 ± 0,6
39 - (gly/PP/S/N)	8,3 ± 0,4
30 - (gly/S/PP/AA)	13,7 ± 1,3
40 - (gly/S/PP/AA/N)	6,3 ± 0,2

N: nitrito de sodio; gly: glicina; S: sacarosa; AA: ácido ascórbico; PP: polifosfatos.

d: desviación estándar.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

N.R.D: no se registró destrucción.

En bibliografía no hay información acerca de la destrucción oxidativa del sorbato en presencia de nitrito de sodio. Sin embargo, Thakur y col. (1990), al estudiar la degradación radiolítica del ácido sórbico en soluciones acuosas al 0,2 % (m/v) que contenían nitrito de sodio (0,2 M) a pH 5,52, encontraron que el porcentaje de destrucción era menor en presencia de nitrito, postulando que esta tendencia se debía a la alta reactividad del ion nitrito hacia los radicales hidroxilo. En consecuencia, la destrucción radiolítica del ácido sórbico, la cual es dependiente de los radicales hidroxilo, sería menor. Este mismo efecto podría esperarse en la destrucción oxidativa de los sorbatos.

Por otra parte, distintos investigadores han señalado que el nitrito ejerce un efecto prooxidante sobre los ácidos grasos presentes en la carne (Willemot y Fillion-Delorme, 1986; Ellis y col., 1968). El mismo comportamiento podría esperarse frente a la degradación oxidativa del ácido sórbico, considerando que su estructura química es semejante a la de los ácidos grasos.

Probablemente, el efecto diverso del nitrito de sodio, en ausencia de ácido ascórbico dependa de cuál de los efectos antes mencionados prevalezca y esto parecería estar relacionado con la composición del sistema.

En cuanto al efecto protector generalmente observado en presencia de ácido ascórbico, el mismo probablemente se deba a la reactividad del ion nitrito frente al ácido ascórbico, que evita la acción prooxidante de este último en la destrucción del sorbato como ya se explicó detalladamente en la sección 4.4.9.4.1.

4.4.9.6 - Influencia de la sacarosa

La sacarosa se agrega, en general, en concentraciones del orden de 0,5 - 1 %, con el objetivo de atenuar el gusto salado en algunos productos cárnicos. No se la emplea como soluto para deprimir la actividad de agua debido a que serían necesarias cantidades incompatibles con el sabor de un producto cárnico.

Si bien en bibliografía existe información acerca de la influencia de la sacarosa sobre la destrucción del sorbato (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1983; Gerschenson y col., 1986), los estudios realizados están orientados a su empleo como humectante en frutas y jugos. En consecuencia, no existe información relacionada con su efecto en presencia de los humectantes y aditivos usados en la elaboración de productos cárnicos.

4.4.9.6.1 - Degradación de sorbato

En la Figura 4.38 se muestra la retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento en presencia de la mezcla de humectantes y sacarosa (sistema 21). En ella se observa que sólo se produjeron pérdidas a 57 °C, tanto en presencia como en ausencia de sacarosa y no habiendo una diferencia apreciable entre ambas.

Para evaluar la influencia de la sacarosa sobre la destrucción del sorbato en presencia de glicina y de los aditivos ya mencionados, se analizaron todas las combinaciones sacarosa - aditivo. En la Tabla 4.34 se muestra el efecto de la sacarosa sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato a 57 °C. Como puede observarse, en general, la sacarosa no afectó en forma significativa la velocidad de destrucción del sorbato, con excepción del caso de los sistemas 11 y 25, en los cuales, la adición de sacarosa (sistemas 24 y 28) aumentó la velocidad de la reacción de destrucción.

En trabajos previos realizados por Arya (1980) y por Vidyasagar y Arya (1983), se reportó que la sacarosa no afectaba significativamente la velocidad de destrucción del ácido sórbico cuando se adicionaba en concentraciones menores al 10 %. En mayores concentraciones, ejercía un efecto protector. Ello se muestra en la Tabla 4.35.

Thakur y col. (1990) informaron que la sacarosa ejercía un efecto acelerante sobre la degradación radiolítica del ácido sórbico y que la magnitud de este efecto se incrementaba con la concentración del azúcar.

4.4.9.6.2 - Pardeamiento no enzimático

En la Figura 4.39 se muestra el efecto de la adición de sacarosa sobre la velocidad de pardeamiento del sistema formado por la mezcla de humectantes utilizada. Como puede apreciarse en la misma, la presencia de sacarosa aumentó la velocidad de pardeamiento. Además, es interesante destacar que luego de, aproximadamente, 106 días de almacenamiento se produjo un incremento en la velocidad de pardeamiento, que se evidenció por el cambio de pendiente observado en el gráfico. Se determinó que el tiempo al cual se producía el incremento en la velocidad de pardeamiento era coincidente con el comienzo de la hidrólisis de la sacarosa. Ello se muestra en la Tabla 4.36. Si se considera que, en este caso, la inclusión de sacarosa acelera la velocidad de pardeamiento pero no afecta, en forma significativa, la velocidad de destrucción del sorbato (Tabla 4.34, sistemas 4 versus 21), se podría concluir que el aumento en la velocidad de pardeamiento se debería, fundamentalmente, a la caramelización de los productos de hidrólisis de la sacarosa.

Figura 4.38: Efecto de la adición de sacarosa sobre la retención de sorbato de potasio a 57 °C en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Sistema sin sacarosa (4) ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C
 Sistema con sacarosa (21) □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C

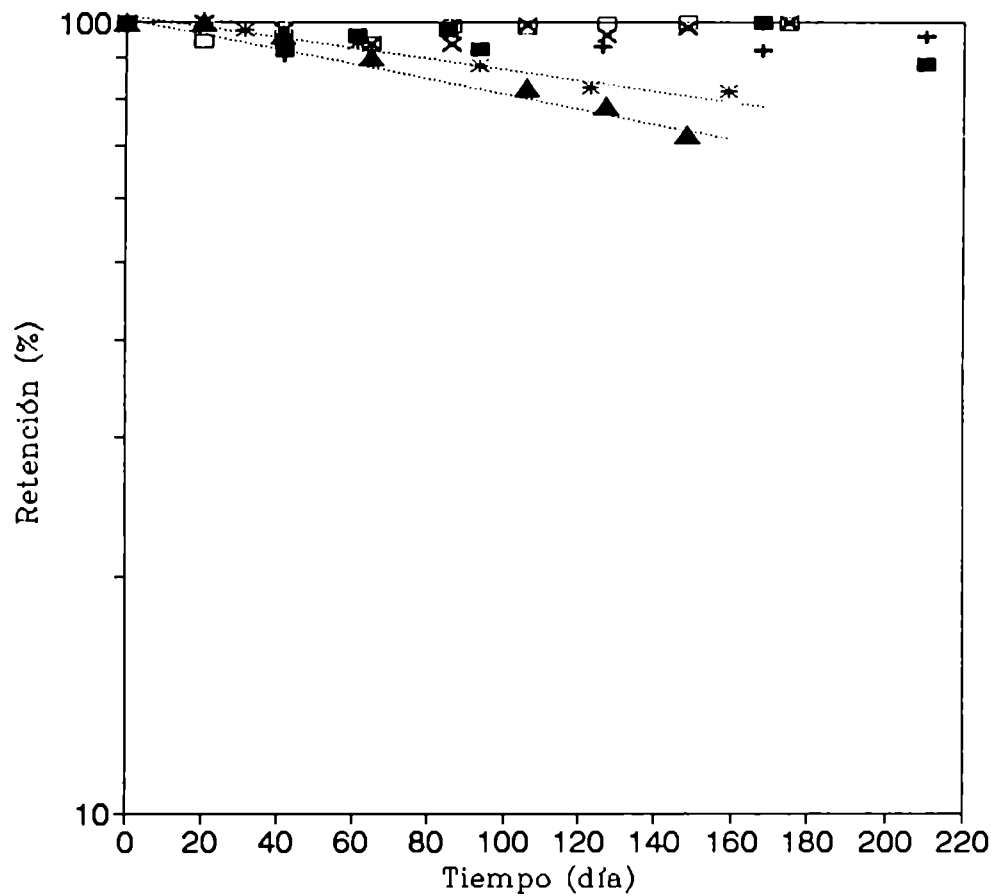


Tabla 4.34: Efecto de la sacarosa sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato a 57 °C, en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Nº de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10 ³ (día ⁻¹)
4 - (-----)	1,4 ± 0,1
21 - (S)	2,2 ± 0,2
11 - (gly)	13,4 ± 0,4 a
24 - (gly/S)	25,9 ± 1,5 a
26 - (gly/PP)	10,0 ± 0,5
27 - (gly/PP/S)	9,9 ± 0,6
25 - (gly/AA)	15,1 ± 0,6 b
28 - (gly/AA/S)	18,9 ± 0,6 b
29 - (gly/PP/AA)	12,1 ± 0,7
30 - (gly/PP/AA/S)	13,7 ± 1,3
31 - (gly/N)	22,2 ± 0,6
34 - (gly/N/S)	22,3 ± 0,6
35 - (gly/AA/N)	14,1 ± 0,8
37 - (gly/AA/N/S)	16,5 ± 0,6
36 - (gly/PP/N)	7,1 ± 0,4
39 - (gly/PP/N/S)	8,3 ± 0,4
38 - (gly/PP/AA/N)	5,8 ± 0,4
40 - (gly/PP/AA/N/S)	6,3 ± 0,2

S: sacarosa; gly: glicina; PP: polisfosfatos; AA: ácido ascórbico;
N: nitrito de sodio.

d: desviación estándar.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

Tabla 4.35: Efecto de la sacarosa sobre la velocidad de degradación del ácido sórbico en soluciones acuosas almacenadas a 37°C (Vidyasagar y Arya, 1983).

Concentración de sacarosa (%)	$K \cdot 10^3$ (hora ⁻¹)
0	2,15 ± 0,18
5	2,07 ± 0,11
10	1,72 ± 0,20
20	1,65 ± 0,13
40	1,11 ± 0,12

Figura 4.39: Efecto de la adición de sacarosa sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático a 57 °C en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

■ Sistema sin sacarosa (4); □ Sistema con sacarosa (21)

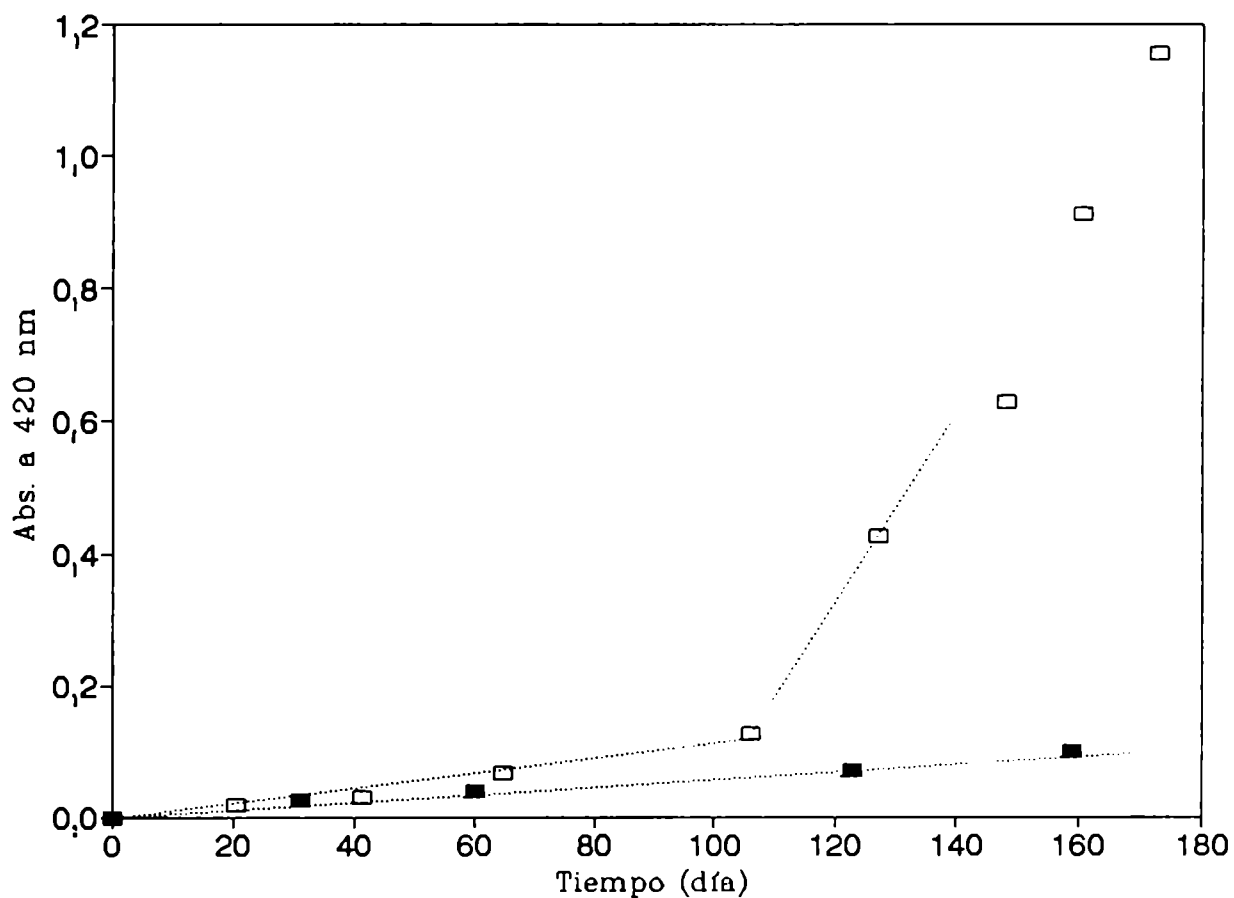


Tabla 4.36: Efecto del tiempo de almacenamiento, a 57 °C sobre el porcentaje de hidrólisis de la sacarosa a pH 5,0.

Tiempo de almacenamiento (días)	Hidrólisis (%)
0	< 1
20	< 1
41	< 1
65	< 1
86	< 1
106	10
127	62
148	71
173	100

Con el objetivo de clarificar esta hipótesis, se almacenó un sistema de composición similar al 21 pero sin el agregado de sorbato de potasio (sistema 46). En este caso, no se registró ni un aumento de la absorbancia a 420 nm ni hidrólisis de la sacarosa aún al cabo de 160 días de almacenamiento a 57°C. Por lo tanto, sería la presencia conjunta de sorbato de potasio y sacarosa la que favorecería la hidrólisis de esta última. Estos resultados indicarían que la interacción entre los compuestos carbonílicos formados por la reacción de destrucción del sorbato junto con la sacarosa y/o los productos de su hidrólisis son los responsables del incremento en la velocidad de pardeamiento observada.

En la Tabla 4.37 se reporta el efecto de la sacarosa sobre la velocidad de la reacción de pardeamiento a 57 °C. Como puede observarse, en algunos sistemas, la sacarosa aceleró la velocidad de pardeamiento mientras que en otros no se observó un efecto apreciable.

En ausencia de glicina, como ya se vio en la Figura 4.39, el agregado de sacarosa (sistema 21) aumentó la velocidad de pardeamiento global. En presencia de glicina o de glicina y polifosfatos, la sacarosa ejerció igual efecto, incrementando la formación de pigmentos pardos. En estos casos, el agregado de sacarosa daría origen a carbonilos activos, luego de la hidrólisis del disacárido, los cuales reaccionarían con el aminoácido produciendo un pardeamiento mayor que en ausencia de sacarosa. En el sistema con glicina únicamente, el aumento de la destrucción del sorbato al agregar sacarosa (sistema 24) sería otra de las causas de una mayor cantidad de carbonilos activos para el pardeamiento.

Tabla 4.37: Efecto de la sacarosa sobre la velocidad de la reacción de pardeamiento del sorbato a 57 °C, en presencia de NaCl y glicerol a pH 5,0.

Nº de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10³ (día⁻¹)
4 - (-----)	0,6 ± 0,1 a
21 - (S)	1,2 ± 0,1 a 15,0 ± 1,3 (1) a
11 - (gly)	21,4 ± 1,0 b
24 - (gly/S)	32,1 ± 2,0 b
26 - (gly/PP)	8,2 ± 0,5 c
27 - (gly/PP/S)	7,3 ± 0,2 33,3 ± 1,8 (2) c
25 - (gly/AA)	34,7 ± 2,8
28 - (gly/AA/S)	31,5 ± 1,4
29 - (gly/PP/AA)	27,4 ± 1,3
30 - (gly/PP/AA/S)	26,4 ± 1,2

S: sacarosa; gly: glicina; PP: polifosfatos; AA: ácido ascórbico.
d: desviación estándar.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

(1) constante de velocidad después de 106 días de almacenamiento.

(2) constante de velocidad después de 28 días de almacenamiento.

Cabe destacar que, cuando se adicionó sacarosa en presencia de glicina y polifosfatos, se observó un aumento de la velocidad de pardeamiento luego de 28 días de almacenamiento. Ello se muestra en la Figura 4.40. Se podría pensar que la presencia de polifosfatos, al inhibir la destrucción del sorbato de potasio (ver sección 4.4.9.3), determinaría la presencia de un menor número de carbonilos activos para el pardeamiento. A este efecto se le opondría el efecto exaltador del pardeamiento ejercido por la glicina, la cual al combinarse con los carbonilos, aumenta dicha reacción. Probablemente, hasta los 28 días de almacenamiento se equilibren ambos efectos (Tabla 4.37). A tiempos más largos, el efecto de la glicina y la hidrólisis de la sacarosa producirían el quiebre observado o sea, el aumento en la velocidad de la reacción estudiada.

En presencia de ácido ascórbico (sistemas 25 y 29), no se observó un aumento en la velocidad de pardeamiento por agregado de sacarosa (sistemas 28 y 30), probablemente como resultado de las interacciones entre el ácido ascórbico, la sacarosa y/o sus productos de hidrólisis, la glicina y los grupos carbonilo producto de la reacción de oxidación del sorbato.

Puede concluirse entonces que el efecto de la presencia de sacarosa en la destrucción de los sorbatos depende de la composición del sistema.

4.4.9.7 - Influencia global de los componentes de la sal de cura sobre la estabilidad

En la Figura 4.41 se muestra el efecto de los componentes de la sal de cura sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio. En ella se aprecia que la presencia conjunta de nitrito de sodio, sacarosa, ácido ascórbico y polifosfatos ejerció un efecto protector sobre la destrucción del sorbato a todas las temperaturas estudiadas. La sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura se vio aumentada por la presencia simultánea de estos aditivos, ya que se registró un aumento significativo de la energía de activación de (10 ± 1) kcal/mol (sistema 11) a (17 ± 7) kcal/mol (sistema 40).

Es de destacar el rol preponderante de los polifosfatos sobre la acción protectora de la mezcla de aditivos, ya que cuando estos no estaban presentes, el valor de la constante de velocidad a 57 °C aumentó de $(6,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ día⁻¹ (sistema 40) a $(16,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$ día⁻¹ (sistema 37), siendo este último valor mayor al del sistema sin ningún aditivo (sistema 11), el cual presentaba una constante de velocidad de $(13,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ día⁻¹. Es decir que la presencia conjunta de los otros aditivos, en ausencia de polifosfatos, ejerció un efecto acelerante.

Figura 4.40: Efecto de la adición de sacarosa sobre la velocidad de pardeamiento no enzimático en presencia de NaCl, glicerol, glicina y polifosfatos a 57 °C.

■ sin sacarosa (sistema 26); □ con sacarosa (sistema 27)

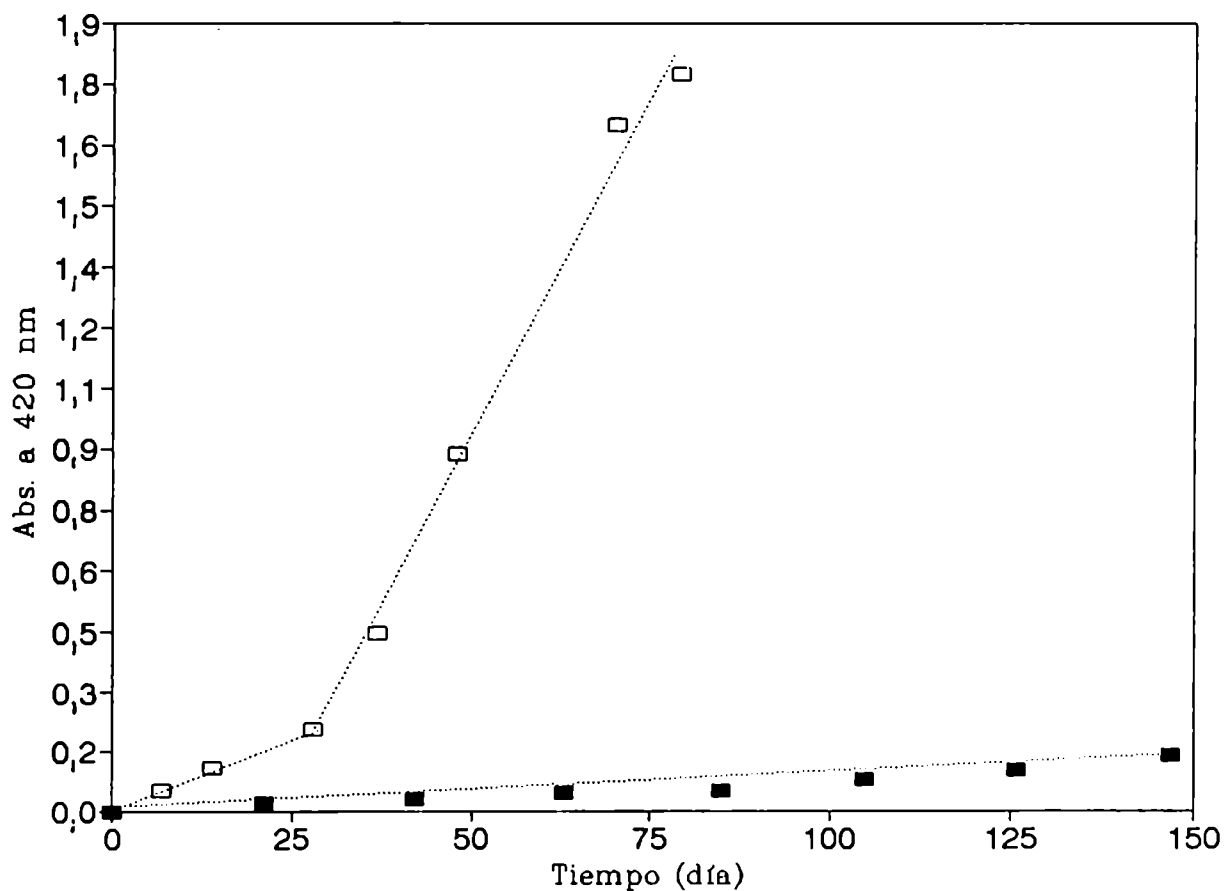
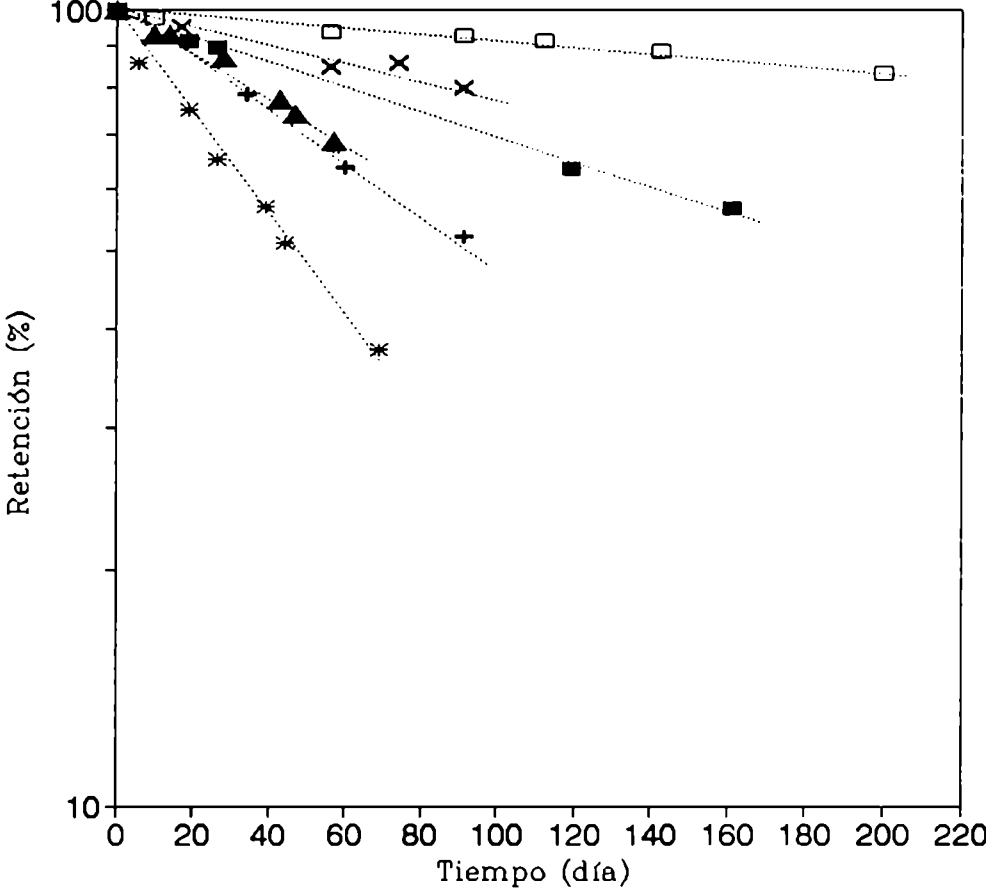


Figura 4.41: Efecto de los componentes de la sal de cura sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio en presencia de NaCl, glicerol y glicina a pH 5,0.

Sistema sin aditivos (11) ■ 33 °C; + 45 °C; * 57 °C
Sistema con aditivos (40) □ 33 °C; x 45 °C; ▲ 57 °C



Estos resultados resaltan la importancia de conocer el efecto de los distintos componentes de un alimento sobre la estabilidad del sorbato, a fin de minimizar su degradación durante el almacenamiento para poder asegurar la estabilidad microbiológica y organoléptica del producto, así como la necesidad de considerar todos los posibles cambios a producirse al introducir una modificación en la composición de un sistema.

4.4.10 - Influencia de la degradación de los sorbatos sobre el desarrollo de pardeamiento no enzimático

Con el objetivo de evaluar la contribución de los compuestos formados por la reacción de destrucción de los sorbatos al desarrollo de pardeamiento, en presencia de la mezcla de humectantes seleccionada y de los distintos aditivos estudiados, se almacenaron algunos sistemas similares a los ya analizados pero sin la adición de sorbato de potasio (sistemas 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53 de la Tabla 4.5).

En la Tabla 4.38 se muestra el efecto de la presencia de sorbato sobre la velocidad de la reacción de pardeamiento a 57 C.

Como puede apreciarse, tanto la presencia de sacarosa como la de ácido ascórbico, en ausencia de glicina (sistemas 46 y 45, respectivamente), no ocasionaron pardeamiento. En base a lo cual se puede deducir que el pardeamiento observado en presencia de sorbato y estos componentes (sistemas 21 y 22) se debería a la polimerización de los productos de la degradación del sorbato y/o a su interacción con la sacarosa o el ácido ascórbico.

En los sistemas que contienen glicina, las velocidades de las reacciones de pardeamiento en presencia de sorbato de potasio se vieron incrementadas en un factor que osciló entre 0,5 y 13 respecto de los de similar composición pero que no contenían sorbato. Estos resultados indicarían que los sistemas conteniendo sorbato de potasio poseen un mayor potencial de formación de pigmentos pardos y ello se debería a algún tipo de interacción entre los sorbatos y los demás componentes del sistema.

Thakur y Arya (1991) al estudiar el rol del ácido sórbico en el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático en presencia de glicina, lisina, glucosa y sacarosa, observaron también que los productos de la degradación del ácido sórbico jugaban un rol preponderante en el desarrollo de pardeamiento.

Tabla 4.38: Efecto de la presencia de sorbato a 57 °C sobre la velocidad de la reacción de pardeamiento no enzimático a pH 5,0 en presencia de NaCl y glicerol.

N° de sistema - (Otros componentes)	(k ± d).10 ³ (día ⁻¹)
46 - (S)	N.R.P
21 - (KS/S)	1,2 ± 0,1 15,0 ± 1,3 (1)
45 - (AA)	N.R.P
22 - (KS/AA)	3,8 ± 0,2
44 - (gly)	3,4 ± 0,3 a
11 - (KS/gly)	21,4 ± 1,0 a
47 - (gly/S)	6,9 ± 0,4 b
24 - (KS/gly/S)	32,1 ± 2,5 b
48 - (gly/AA)	9,6 ± 0,5 c
25 - (KS/gly/AA)	34,7 ± 2,8 c
49 - (gly/PP)	0,9 ± 0,1 d
26 - (KS/gly/PP)	8,2 ± 0,5 d
50 - (gly/AA/S)	13,6 ± 0,2 e
28 - (KS/gly/AA/S)	31,5 ± 1,4 e
51 - (gly/PP/S)	4,5 ± 0,1 f 23,7 ± 1,6 (3)
27 - (KS/gly/PP/S)	7,3 ± 0,2 f 33,3 ± 1,8 (2)
52 - (gly/AA/PP)	11,4 ± 0,4 g
28 - (KS/gly/AA/PP)	27,4 ± 1,3 g
53 - (gly/AA/PP/S)	15,2 ± 0,7 h
30 - (KS/gly/AA/PP/S)	26,4 ± 1,2 h

Todos los sistemas contienen 3,5 % de NaCl y glicerol en cantidad suficiente para deprimir la actividad de agua a 0.91.

S: sacarosa; KS: sorbato de potasio; AA: ácido ascórbico; gly: glicina; PP: polifosfatos.

d: desviación estándar.

N.R.P : no se registró pardeamiento.

Las constantes (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

(1) constante de velocidad después de 106 días de almacenamiento.

(2) constante de velocidad después de 28 días de almacenamiento.

(3) constante de velocidad después de 42 días de almacenamiento.

A fin de ilustrar la magnitud del efecto que la presencia de los sorbatos ejerció sobre el desarrollo de pardeamiento, se calculó el tiempo y el porcentaje de destrucción de sorbato de potasio necesarios para alcanzar una absorbancia de 0,1 a 420 nm (color amarillento). Ello se muestra en la Tabla 4.39.

En todos los sistemas, en presencia de sorbato, el tiempo necesario para obtener un color amarillento fue significativamente menor que cuando el sorbato estaba ausente. Por otra parte, se requirieron pequeños porcentajes de destrucción, menores al 20 %, para evidenciar pardeamiento. Estos resultados resaltan la importancia de tratar de minimizar la destrucción del sorbato para asegurar la estabilidad tanto microbiológica como organoléptica.

En todos los sistemas estudiados en este trabajo, se verificó, a un nivel de probabilidad del 95 % que existe una correlación entre el logaritmo natural del porcentaje de destrucción del sorbato de potasio y el incremento de la absorbancia a 420 nm. Ello se muestra en la Figuras 4.42, 4.43 y 4.44 para algunos sistemas.

La correlación antes mencionada es una expresión de la significativa relación que existe entre la destrucción de los sorbatos y el desarrollo de pardeamiento.

Tabla 4.39 : Tiempo y destruccion de sorbato necesaria para alcanzar una absorbancia de 0,1 a 420 nm en sistemas modelo acuosos que contienen NaCl y glicerol.

N de sistema - (Otros componentes	Tiempo (dia)	Destruccion de KS (%)
46 - (S)	N.R.P	
21 - (KS/S)	91	15,1
45 - (AA)	N.R.P	
22 - (KS/AA)	28,5	5,6
44 - (gly)	62,1	
11 - (KS/gly)	13,6	10,1
47 - (gly/S)	16,1	
24 - (KS/gly/S)	0,4	7,4
48 - (gly/AA)	9,5	
25 - (KS/gly/AA)	0,51	8,7
49 - (gly/PP)	120,9	
26 - (KS/gly/PP)	11,5	11,1
51 - (gly/S/PP)	23,1	
27 - (KS/gly/S/PP)	14	19,43
50 - (gly/S/AA)	7,9	
28 - (KS/gly/S/AA)	2,1	7,2
52 - (gly/PP/AA)	10,6	
29 - (KS/gly/PP/AA)	2,1	7,4
53 - (gly/S/AA/PP)	5,3	
30 - (KS/gly/S/AA/PP)	3,2	11,4

S: sacarosa; KS: sorbato de potasio; AA: acido ascorbico; gly: glicina; P: polifosfatos.

N.R.P: no se registro pardeamiento al cabo de 180 dias.

El pH de todos los sistemas es 5,0.

La actividad de agua de todos los sistemas es 0,91.

Figura 4.42: Correlación entre el logaritmo natural del porcentaje de retención de sorbato de potasio y la absorbancia a 420 nm en sistemas de pH 5,0 y almacenados a 57 °C.

■ sistema 1 (agua, sorbato de potasio)

x sistema 10 (agua, sorbato de potasio, glicerol, glicina)

* sistema 14 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol, EDTA)

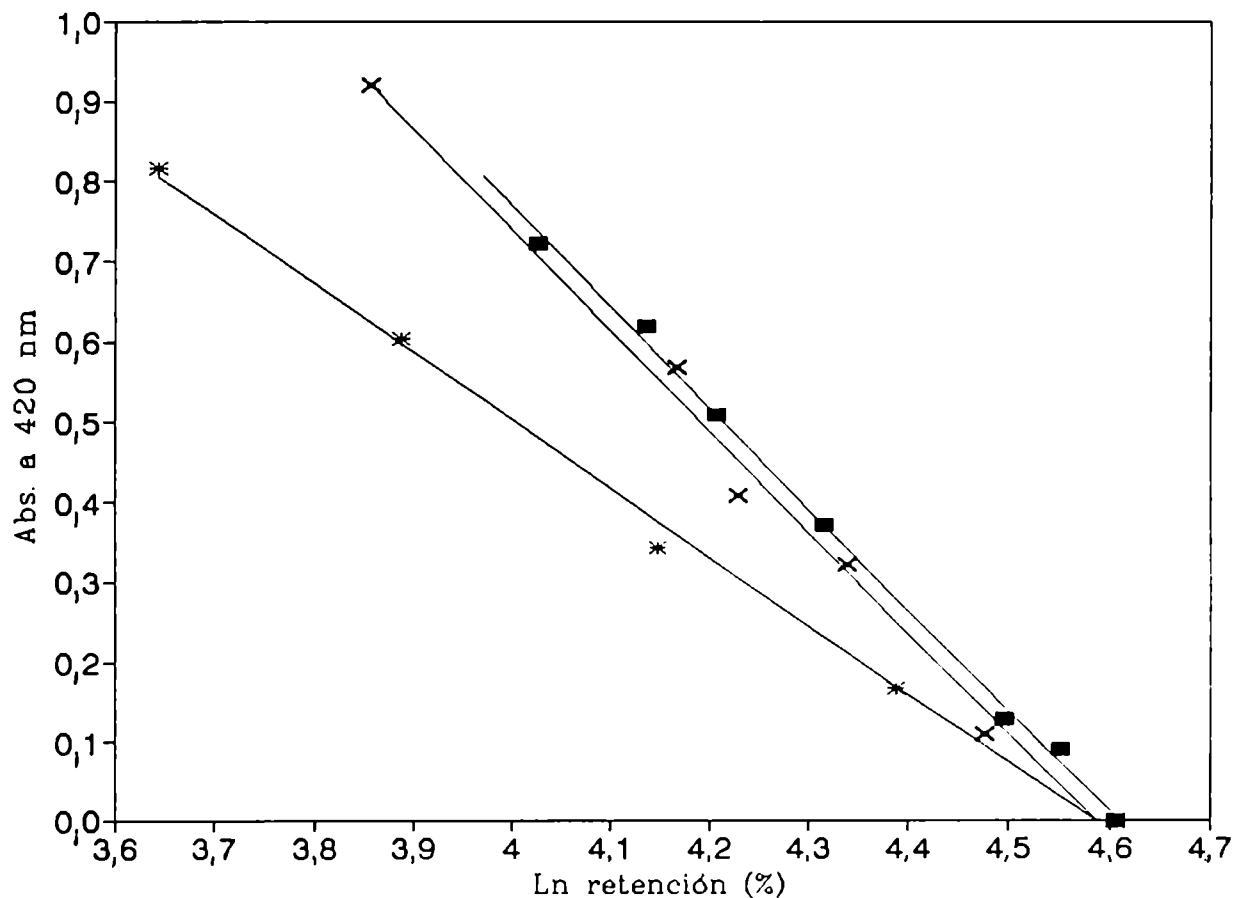


Figura 4.43: Correlación entre el logaritmo natural del porcentaje de retención de sorbato de potasio y la absorbancia a 420 nm en sistemas almacenados a 57 °C.

- sistema 12 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicina)
- x sistema 13 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol, glicina; envasado en plástico)
- * sistema 30 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol, glicina, sacarosa, ácido ascórbico, polifosfatos)

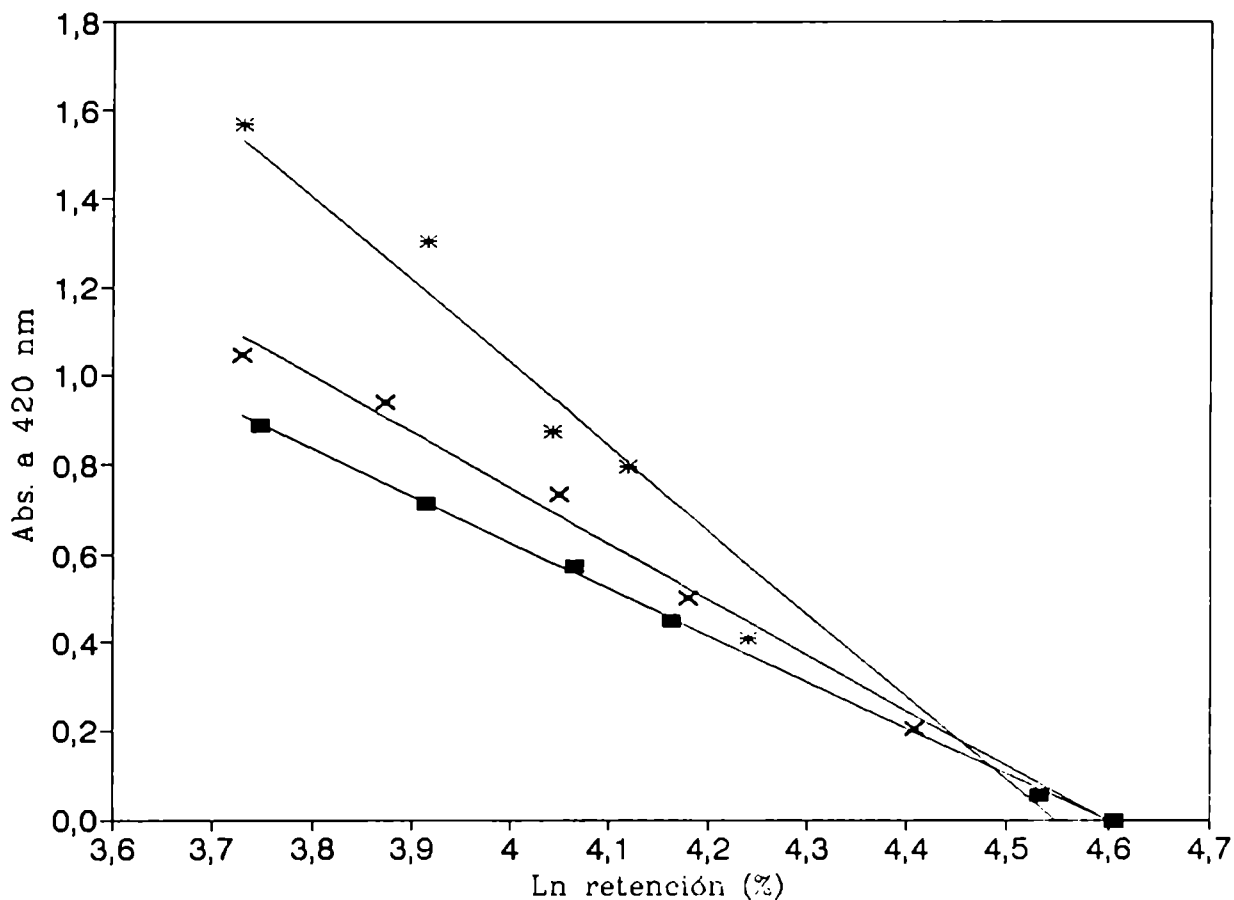
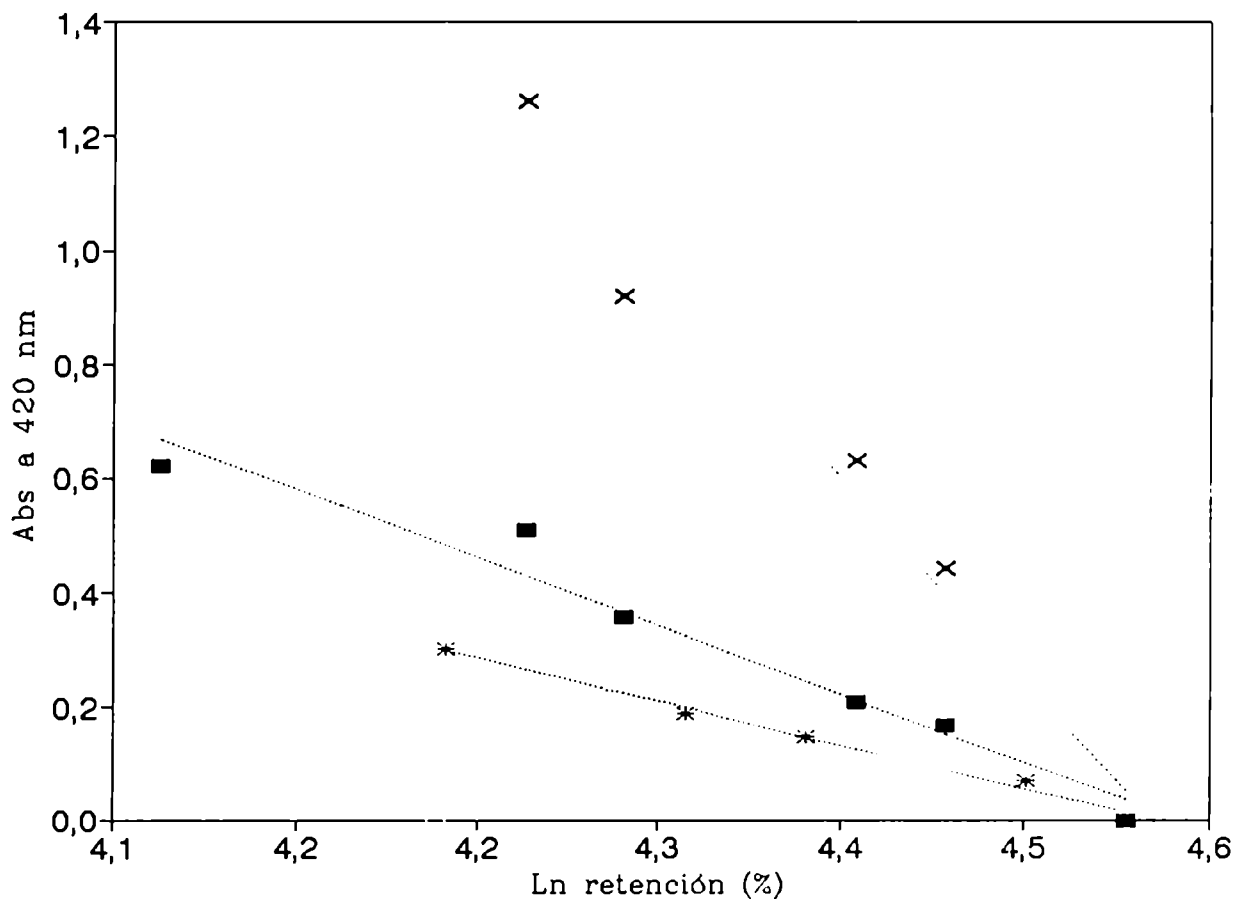


Figura 4.44: Correlación entre el logaritmo natural del porcentaje de retención de sorbato de potasio y la absorbancia a 420 nm en sistemas de pH 5,0 y almacenados a 57 °C.

■ sistema 22 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol, ácido ascórbico)

x sistema 25 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol, glicina, ácido ascórbico)

* sistema 26 (agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol, glicina, polifosfatos)



4.5 - CONCLUSIONES

A partir del análisis, en sistemas modelo acuosos, de la estabilidad del sorbato de potasio frente a la degradación oxidativa y, de la evolución del pardeamiento que se genera conforme se produce la destrucción del preservador, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

* En todos los sistemas estudiados, la reacción de degradación oxidativa presentó una cinética de primer orden y el pardeamiento no enzimático inducido por la degradación del preservador ajustó a una cinética de orden cero.

* Tanto las constantes de velocidad de la reacción de destrucción de los sorbatos como las de la reacción de pardeamiento mostraron una dependencia con la temperatura de tipo Arrhenius.

* En todos los sistemas modelo en los cuales no se registraron pérdidas en el contenido de sorbatos, tampoco se verificó la formación de pigmentos pardos.

* En general, las energías de activación obtenidas para la reacción de destrucción de los sorbatos fueron significativamente menores que las de la reacción de pardeamiento. Además se observó que, conforme se elevó la temperatura en el rango comprendido entre 33 y 57°C, la reacción de pardeamiento presentó constantes específicas de velocidad (k) mayores.

* En el sistema formado por agua, sorbato de potasio, NaCl, glicerol y glicina no se observó un cambio en la sensibilidad de la reacción de destrucción de los sorbatos ni en la reacción de pardeamiento frente al cambio de temperatura al pasar del rango 33 - 57°C al de 70 - 90°C.

* Un incremento de pH de 5,0 a 6,0 produjo una disminución significativa en la velocidad de la reacción de destrucción de los sorbatos y en la velocidad de la reacción de pardeamiento. En presencia de NaCl, glicerol y glicina, el incremento de pH mencionado provocó una elevación en la energía de activación de ambas reacciones. Parecería así, que el efecto protector del aumento de pH disminuye su eficiencia con el incremento de temperatura.

* El empleo de ácido cítrico para ajustar el pH a 5,0 en reemplazo de ácido ortofosfórico mostró ejercer un efecto protector, tanto sobre de degradación de los sorbatos como sobre la formación de pigmentos pardos. Este comportamiento parecería estar relacionado a la mayor

la mayor capacidad del ácido cítrico para complejar al catión hierro, ya que éste, al estado libre, cataliza la oxidación del sorbato.

* En general, la depresión de la actividad de agua a 0,91 disminuyó la velocidad de la reacción de destrucción de los sorbatos, con excepción del caso en que se empleó glicerol como humectante, el cual aceleró la destrucción. La magnitud del efecto dependió del humectante o mezcla de ellos empleada para ajustar la actividad de agua.

En el caso del empleo de glicerol, se incrementó la sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura.

* El empleo de NaCl al 13,00 % produjo una importante acción protectora, ya que no se registraron ni pérdidas en el contenido de sorbatos ni un incremento de la absorbancia a 420 nm aún al cabo de 140 - 180 días de almacenamiento a 33, 45 y 57°C.

* La combinación de NaCl al 3,50 % (m/m) y glicerol en cantidad suficiente para ajustar la actividad de agua a 0,91, mostró un efecto protector sobre la degradación de los sorbatos y sobre la formación de pigmentos pardos. Esta combinación de humectantes resulta de interés ya que contiene la máxima concentración de NaCl admisible en cuanto a palatabilidad.

* El reemplazo parcial de NaCl por KCl en la mezcla de humectantes antes mencionada, ejerció una acción protectora adicional sobre la destrucción del sorbato de potasio.

* La inclusión de glicina produjo un importante incremento en la velocidad de destrucción de los sorbatos. Este efecto fue más marcado en el caso de emplear glicerol como humectante. También se observó una mayor desarrollo de pardeamiento. La mayor velocidad de formación de pigmentos pardos en presencia de glicina estaría relacionada con el diferente mecanismo que le da origen: en ausencia de glicina, el pardeamiento se produce por la polimerización de los compuestos carbonílicos; cuando se adiciona glicina, ésta reacciona con dichos compuestos vía reacción de Maillard. El potencial formador de pigmentos pardos de esta reacción es de mayor magnitud. Como consecuencia de esto, una destrucción de sorbato menor al 20 % es suficiente para evidenciar un deterioro visible del color en estos sistemas.

* El empleo de envases de polietileno, debido a su elevada permeabilidad al oxígeno, promovió la degradación de los sorbatos y, en consecuencia, incrementó la velocidad de formación de pigmentos pardos.

* La adición de EDTA ejerció un efecto exaltador sobre la destrucción del sorbato y sobre la formación de pigmentos pardos. El efecto fue independiente de la concentración de EDTA en el rango comprendido entre 100 y 1000 ppm. Este comportamiento se debería a que el EDTA tiene capacidad de favorecer el desprendimiento de iones hierro (III) del envase empleado (vidrio o polietileno) al complejarlos, pudiendo ser estos complejos eficaces catalizadores de reacciones de oxidación, tales como la destrucción del sorbato.

* La adición de propilgalato al 0,003 % (m/m) disminuyó la destrucción del sorbato y la formación de pigmentos pardos.

* El ácido ascórbico presentó un comportamiento dual: en ausencia de nitrito de sodio, ejerció un efecto prooxidante; en presencia de nitrito de sodio actuó en forma protectora.

El efecto prooxidante del ácido ascórbico estaría asociado a la capacidad de éste de reducir el estado de oxidación del catión hierro (III) mediante una reacción tipo Fenton, en la cual se originan radicales hidroxilo, los cuales aceleran la reacción de autooxidación del sorbato.

El efecto protector del ácido ascórbico, en presencia de nitrito de sodio, se debería a que ambos reaccionan, consumiéndose el nitrito completamente y viéndose así inhibido de reaccionar con los sorbatos favoreciendo la desaparición de los mismos.

En general, la presencia de ácido ascórbico aceleró el desarrollo de pardeamiento. Siendo los productos formados por la degradación del sorbato los principales responsables de este incremento.

* El efecto de la adición de nitrito de sodio sobre la destrucción de los sorbatos fue diverso. En presencia de ácido ascórbico, en general, actuó en forma protectora. En ausencia de ácido ascórbico se observaron distintas tendencias estando vinculadas a la composición del sistema.

* En general, la adición de sacarosa al 1,000 % (m/m) no afectó en forma significativa la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato. Sin embargo, en algunos casos, ejerció un efecto acelerante probablemente vinculado a la composición del sistema.

Con respecto al efecto de la sacarosa sobre la velocidad de pardeamiento, se observó que, en la mayoría de los casos, incrementó la velocidad de formación de pigmentos pardos. Con excepción de aquellos sistemas modelo en que se adicionó en forma conjunta sacarosa y ácido ascórbico, en los cuales no se registró un aumento de la velocidad de pardeamiento. Asimismo se verificó que la presencia conjunta de sorbato de potasio y sacarosa favorecía la hidrólisis de esta última en el sistema conteniendo NaCl y glicerol como humectantes.

* Los polifosfatos disminuyeron la velocidad de oxidación del sorbato y el desarrollo de pardeamiento.

* La presencia conjunta de nitrito de sodio, ácido ascórbico, sacarosa y polifosfatos (componentes de la sal de cura) ejerció un efecto protector sobre la destrucción del sorbato.

* Los productos formados por la degradación de los sorbatos jugaron un rol preponderante en el desarrollo de pardeamiento, ya que en todos los sistemas analizados, la velocidad de formación de pigmentos pardos fue notoriamente mayor en presencia de este preservador.

En todos los sistemas modelo estudiados se verificó, para un nivel de probabilidad del 95 %, que existe una correlación entre el logaritmo natural del porcentaje de destrucción del sorbato de potasio y el incremento de la absorbancia a 420 nm.

* Podemos decir así que, en la formulación de alimentos a los que se adiciona sorbato de potasio, se debe tener en cuenta las múltiples variables que afectan su estabilidad, especialmente considerando que su degradación atenta contra la estabilidad microbiológica y promueve el desarrollo de pardeamiento, el cual conlleva al deterioro organoléptico y nutricional del producto.

5. ESTABILIDAD DEL ACIDO SORBICO EN HOMOGENATOS CARNICOS

5.1 - INTRODUCCION, p. 243

- 5.1.1 - Preservación de carnes, p. 243
- 5.1.1.1 - Carnes de humedad intermedia, p. 243
- 5.1.1.1.1 - Preparación de carnes de humedad intermedia, p. 244
- 5.1.1.2 - Carnes de alta humedad, p. 246
- 5.1.1.3 - Carnes curadas, p. 247
- 5.1.1.4 - Rol de los sorbatos en la preservación de productos cárnicos, p. 250
- 5.1.2 - Reacciones de deterioro inducidas por la presencia de sorbatos y/o por sus productos de degradación, p. 251

5.2 - OBJETIVOS, p. 253

5.3 - MATERIALES Y METODOS, p. 254

- 5.3.1 - Homogenatos cárnicos, p. 254
- 5.3.1.1 - Composición de los homogenatos cárnicos, p. 255
- 5.3.1.2 - Preparación de los homogenatos cárnicos, p. 255
- 5.3.2 - Medición del pH, p. 257
- 5.3.3 - Medición de la actividad de agua, p. 257
- 5.3.4 - Condiciones de almacenamiento, p. 257
- 5.3.5 - Determinación de sorbato de potasio, p. 258
- 5.3.6 - Análisis estadístico, p. 258

5.4 - RESULTADOS Y DISCUSION, p. 259

- 5.4.1 - Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato de potasio, p. 259
- 5.4.2 - Influencia de la temperatura, p. 259
- 5.4.3 - Influencia de otras variables analizadas, p. 266
- 5.4.3.1 - Influencia del pH, p. 268
- 5.4.3.2 - Influencia del acidificante, p. 268
- 5.4.3.3 - Influencia del humectante usado para deprimir la actividad de agua, p. 271
- 5.4.3.4 - Influencia de la cocción de la carne, p. 271
- 5.4.3.5 - Influencia de la atmósfera de almacenamiento, p. 274
- 5.4.3.6 - Influencia de aditivos, p. 274

5.5 - CONCLUSIONES, p. 278

5. ESTABILIDAD DEL ACIDO SORBICO EN HOMOGENATOS CARNICOS

5.1 - INTRODUCCION

5.1.1 - Preservación de carnes

Debido a su alto contenido en agua y nutrientes, la carne fresca sufre rápidamente deterioro microbiano. Por ello, se deben inactivar o inhibir los microorganismos presentes.

Los métodos de preservación comúnmente usados para lograr el objetivo antes mencionado son: esterilización, congelación, enfriamiento, liofilización, secado, curado, acidificación, fermentación acidoláctica, ahumado y almacenamiento en atmósfera controlada. Todos estos procesos de preservación están basados en el control de parámetros tales como temperatura, actividad de agua, pH, potencial redox, adición de preservadores, etc. Muchas veces, la estabilidad microbiológica del producto se logra mediante la combinación de algunos de estos parámetros, a los que se ha denominado "obstáculos" para el crecimiento microbiano (Leistner y Rödel, 1975).

5.1.1.1 - Carnes de humedad intermedia

Las carnes de humedad intermedia son alimentos parcialmente deshidratados que tienen una concentración de sólidos disueltos que permite ligar el agua remanente de forma tal que se logra la inhibición de bacterias, hongos y levaduras (Ledward, 1981). La actividad de agua de estos productos está comprendida en el rango entre 0,65 - 0,90 y en general, están estabilizadas por otros "obstáculos" adicionales, como calor, adición de preservadores, control de pH (Leistner y Rödel, 1975).

Las carnes de humedad intermedia, debido a que no requieren condiciones de refrigeración durante su procesamiento y/o almacenamiento, constituyen una alternativa interesante en países en vías de desarrollo donde los procesos tradicionales de preservación (esterilización, congelación), resultan costosos.

El principio de reducir la actividad de agua de un alimento para prolongar su vida útil ha sido usado desde hace cientos de años. La elaboración del charqui en América o la del biltong en África, son ejemplos de esta tecnología. En estos productos se adiciona sal, azúcar y especias a la carne que luego se deshidrata al sol. Como resultado de este proceso, se obtiene un producto seco y fibroso.

Actualmente, en Sudáfrica se ha permitido y recomendado la adición de 0,1 % de sorbato de potasio a la carne cruda con el objetivo de aumentar la vida útil de los productos con ella preparada (Leistner, 1985).

5.1.1.1.1 - Preparación de carnes de humedad intermedia

Para lograr la estabilidad microbiológica de una carne de humedad intermedia se debe deprimir su actividad de agua a un nivel tal que no permita la proliferación de patógenos. En la Tabla 5.1 se presentan los solutos que es posible adicionar para deprimir la actividad de agua y se indica la eficiencia de los mismos.

Tabla 5.1: Efectividad de distintos solutos para deprimir la actividad de agua (Ledward, 1981).

Solutos	Agua (g/100 g de soluto en base seca) a una a_w de:					
	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95
Cloruro de sodio	16	270	380	560	950	1668
Fructosa	30	40	50	65	90	140
Glucosa	12	54	63	81	114	207
Sacarosa	38	47	56	66	77	188
Glicerol	64	82	108	145	215	625
Propilen-glicol	65	84	113	168	270	650
Sorbitol	46	55	67	90	135	485
1,3-butilen-46 glicol		57	80	124	205	615
Polietilen-glicol	38		60		120	

El NaCl es el más efectivo para deprimir la actividad de agua. Sin embargo, la cantidad necesaria resulta excesiva desde el punto de vista organoléptico y no es aconsejable el consumo de altos niveles de sal por razones médicas. Por otra parte, el uso de azúcares en carnes no es compatible con el sabor de un producto cárnico en occidente.

El uso de glicerol resulta adecuado ya que éste es soluble en agua, no es volátil, es incoloro e inodoro y altera el flavor en menor proporción que la sal o los azúcares. Además, el glicerol es bien tolerado por el organismo pues es fácilmente metabolizado.

Por las razones antes mencionadas, en las carnes de humedad intermedia, usualmente se adiciona sal en la concentración adecuada para el sazónamiento del producto y glicerol. Diversas patentes de carnes de humedad intermedia emplean esta combinación de humectantes para estabilizar el producto (Ledward, 1981).

A pesar de que el glicerol otorga menor sabor dulce que los azúcares, imparte algo de dulzor al producto. Por esta razón se ha estudiado la posibilidad de emplear otros humectantes tales como hidrolizados de proteínas y dextranos. Sin embargo, estos compuestos son menos efectivos que el glicerol para deprimir la actividad de agua. Uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de carnes de humedad intermedia radica en la falta de éxito en encontrar humectantes que no alteren el flavor del producto.

Por otra parte, se ha observado que el glicerol tiene un efecto negativo sobre la calidad de las carnes de humedad intermedia, ya que participa activamente en el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático y en la degradación del colágeno (Webster y col., 1986).

Si bien la depresión de la actividad de agua hasta 0,86 - 0,90 permite controlar el crecimiento de bacterias, es necesario adicionar algún antimicrobiano para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. Para ello, usualmente, se emplea sorbato de potasio.

La disminución de pH, es otro de los factores a modificar en la elaboración de carnes de humedad intermedia ya que actúa en forma sinérgica con la depresión de la actividad de agua. Por ejemplo, a pH 6,0 es necesario adicionar un 16 % de NaCl para inhibir el crecimiento de *S. Aureus* mientras que a pH 4,5 solamente se requiere un 8 - 10 % de sal (Ledward, 1981).

En base a lo comentado, en general, para la elaboración de carnes de humedad intermedia se adiciona NaCl (\approx 5 %), un soluto inerte para deprimir la actividad de agua a aproximadamente 0,85 (por

ej. glicerol), un antimicrobiano tal como sorbato de potasio y otros aditivos (Ledward, 1981).

5.1.1.2 - Carnes de alta humedad

La tendencia actual en cuanto a la preservación de carnes es la obtención de productos estables a temperatura ambiente (a fin de disminuir los costos en el consumo de energía necesaria para la refrigeración), sin gran cantidad de aditivos, con bajo contenido de sodio y bajo nivel de nitritos. En base a algunos de estos parámetros, en los últimos años se han desarrollado productos cárnicos de alta humedad ($a_w > 0,90$) estables a temperatura ambiente. En la Tabla 5.2 se indican las características de estos productos.

Tabla 5.2: Características de los productos cárnicos autoestables (Leistner, 1992).

Calentamiento	Tratamiento térmico moderado tal que el centro del producto alcance una temperatura de 70 -110 °C. El proceso se realiza en envases cerrados. Tiene como finalidad inactivar todas la bacterias esporuladas.
Estabilización	El desarrollo de las esporas que sobrevivieron al tratamiento térmico se inhibe mediante la depresión de la a_w , pH y potencial redox.
Almacenamiento	No son necesarias condiciones de refrigeración.

Las carnes de alta humedad presentan las siguientes ventajas:

- * La aplicación de un tratamiento térmico suave mejora la calidad nutricional y organoléptica del producto y disminuye el gasto de energía.
- * Se simplifica la distribución del producto y se ahorra energía al no ser necesaria su refrigeración.
- * Se adiciona nitrito de sodio en baja concentración (< 50 ppm), solamente para otorgar el flavor característico.

En función de los "obstáculos" aplicados para estabilizar al producto se pueden distinguir cuatro grupos:

* Productos cuya estabilización se basa principalmente en la depresión de la actividad de agua.

* Productos cuya estabilización se basa principalmente en la depresión del pH.

* Productos cuya estabilización se basa principalmente en la aplicación de un tratamiento térmico suave que produce un daño subletal a las esporas.

* Productos cuya estabilización se basa en la aplicación de varios factores de estrés microbiano en forma balanceada.

En todos los casos, se requiere, además, para asegurar la estabilidad del producto, la adición de preservadores tales como antioxidantes y antimicrobianos (Leistner, 1992)

5.1.1.3 - Carnes curadas

El nitrito de sodio se ha agregado a la carne durante siglos y es el responsable del color y flavor característico de las carnes curadas. Probablemente, al comienzo, su adición fue accidental. De acuerdo a Binkerd y Kolari (1975) las primeras prácticas de preservación de carne se practicaron aproximadamente en el año 3000 antes de Cristo, en las zonas costeras de los desiertos de Asia occidental, donde la sal contiene abundantes impurezas de nitratos y borax. Sin embargo, el primer informe acerca de los beneficios de la adición de nitrito sobre las propiedades organolépticas de la carne data de 1891 (Pierson y Smoot, 1982). En estos años, se comenzaron a estudiar las propiedades antimicrobianas del nitrito y en la década del cincuenta se inició el estudio de los aspectos toxicológicos, cuyos resultados indicaron que la interacción de los nitritos con las aminos secundarias presentes en la carne conducía a la formación de nitrosaminas, las cuales tienen propiedades carcinogénicas. Después de numerosos estudios, en 1974, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos hizo las siguientes recomendaciones:

* Restringir el uso de nitrato a carnes curadas deshidratadas y/o a embutidos fermentados.

* Limitar el uso de nitrito de sodio a 50 ppm en las carnes enlatadas.

* Eliminar el uso de nitrito o nitrato en alimentos cárnicos para niños.

* Limitar la adición de nitrito a 156 ppm en todas los embutidos curados cocidos y en las carnes cocidas y curadas con excepción del tocino.

* La adición de nitrito al tocino no debe superar las 125 ppm en presencia de 550 ppm de ascorbato de sodio.

* Investigar y evaluar preservativos alternativos que permitan reemplazar o reducir el nivel de nitritos necesario para proveer la protección necesaria contra el botulismo en carnes curadas.

En cuanto a la toxicidad del nitrito, Tannenbaum (1976) reportó que la dosis letal de nitrito es 300 mg/kg de peso. Otros autores han encontrado que el nitrito es un agente hipotensor (Rubin y col., 1963), un disruptor de la función de la glándula tiroides (Emerick y col., 1963), un agente mutagénico (Di Fate, 1977) y carcinogénico (U.S.D.A, 1978; Newberne, 1979). Además, el nitrito disminuye el transporte de oxígeno en la sangre, ya que produce la oxidación de hemoglobina a metahemoglobina.

Las nitrosaminas han sido encontradas en diferentes alimentos, carnes, quesos, hongos, bebidas alcohólicas y es un hecho demostrado que tienen acción carcinogénica. Su toxicidad depende de su composición; por ejemplo, en el caso de la nitrosodimetilamina, la dosis letal 50 en ratas es de 27 a 41 mg/kg de peso, mientras que para la dinitroso-n-butilamina es 1200 mg/kg de peso (Lijinsky y Epstein, 1970).

Si bien se han encontrado nitrosaminas en diferentes alimentos, la nitrosopirrolidina solamente ha sido encontrada en el tocino y los niveles reportados de ésta y de otras nitrosaminas en carnes, han sido variables.

La ingesta de nitrito por el consumo de carnes curadas representa de un 2 % a un 25 % de la ingesta total de nitrito, el porcentaje restante proviene de otras fuentes, una de las cuales es la formación *in vivo* de nitrito en el intestino por acción de enzimas proteolíticas de origen microbiano (Tannenbaum y col., 1978).

Por otra parte, los beneficios de la adición de nitrito sobre la salud humana en cuanto al riesgo del botulismo han sido demostrados a través de los años. El nitrito de sodio es un aditivo multifuncional, ya que además de ser el responsable del color y flavor característico de las carnes curadas, actúa como antioxidante y es un excelente agente antimicrobiano que brinda protección contra el desarrollo del *C. botulinum* y la producción de la toxina. Todas estas propiedades, hacen que su reemplazo por otro aditivo sea difícil (Pierson y Smoot, 1982).

En relación a los posibles sustitutos del nitrito como agentes antibotulínicos en la elaboración de carnes curadas, se han realizado diferentes estudios, a partir de los cuales surge que algunas de las alternativas más promisorias son el uso de parabenos, acidulantes biológicos y sorbatos. A continuación se analizará la factibilidad de los sorbatos.

El ácido sórbico es comúnmente usado en la elaboración de embutidos cárnicos, para inhibir el desarrollo superficial de hongos durante el período de maduración del producto. Un uso potencial promisorio parece ser su empleo como parcial sustituyente del nitrito de sodio en las carnes curadas.

En numerosos trabajos se ha demostrado que el ácido sórbico o el sorbato de potasio inhiben el desarrollo del *C. botulinum* por sí mismos o en combinación con bajas concentraciones de nitrito (Ivey y Robach, 1978; Sofos y Busta, 1981).

Ivey y col. (1978) informaron que la adición de sorbato de potasio a la sal de cura aumentaba significativamente el tiempo necesario para el desarrollo de deterioro microbiológico en muestras almacenadas a 27°C, e inhibía el desarrollo del *C. botulinum* independientemente de la presencia de 40 ppm de nitrito. Pierson y col. (1979) demostraron que la adición de 0,26 % de sorbato de potasio en combinación con 40 ppm de nitrito en el tocino era más efectiva en retardar la formación de la toxina botulínica que la adición de 120 ppm de nitrito. En trabajos posteriores, además, se estableció que el tocino elaborado comercialmente con sorbato de potasio (0,26 %) y nitrito de sodio (40 ppm) contenía niveles más bajos de N-nitrosopirrolidina que el elaborado con 120 ppm de nitrito (Pierson y col., 1980; Robach y col., 1980).

Sin bien no hay dudas con respecto a la capacidad del sorbato en cuanto a su efectividad como agente antibotulínico en carnes curadas, su uso conjunto con nitritos todavía no ha sido permitido por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos debido a la presencia de posibles reacciones alérgicas (Berry y Blumer, 1981), si bien los resultados no han sido concluyentes.

Wagner y Busta, 1983) estudiaron las propiedades antibotulínicas del nitrito, sorbato, pirofosfato ácido de sodio, pH y cloruro de sodio en homogenatos de cerdo y encontraron que el sorbato solo, es inefectivo a pH 6,3, pero a pH 5,5 ejerce un fuerte efecto inhibitorio. Además, el nitrito (25 ó 50 µg/g), y/o pirofosfato ácido de sodio ejercen un efecto sinérgico con el sorbato. En carnes picadas enlatadas, la adición de 0,2 % de ácido sórbico retarda el desarrollo y la producción de toxina, mientras que una concentración de 0,1 % no resulta efectiva (Ivey y Robach, 1978).

En cuanto al efecto del sorbato sobre las características organolépticas de los productos cárnicos, los ensayos de evaluación sensorial, en general, indican que el sorbato no afecta el flavor del producto, obteniendo una aceptabilidad similar o en algunos casos ligeramente menor a la de los productos formulados sin este preservador (Price y Stevenson, 1979; Paquette y col., 1980; Kahle, 1980).

En una serie de trabajos realizados por investigadores japoneses, se ha reportado que la combinación de ácido sórbico y nitrito de sodio en altas concentraciones *in vitro* conduce a la formación de una serie de compuestos con actividad genotóxica (sección 1.2.2.2). Cabe destacar que, las condiciones óptimas para la formación de estos compuestos no serían las empleadas en la elaboración de carnes curadas. No obstante, se deben realizar más investigaciones para establecer si durante la elaboración, el almacenamiento o *in vivo* se forman estos productos y cuál es su incidencia sobre la salud.

En base a lo mencionado, la adición de sorbato de potasio podría reemplazar total o parcialmente al nitrito en cuanto a su función antibotulínica. Debemos recordar, sin embargo, lo indispensable del nitrito en las carnes curadas en cuanto al aspecto organoléptico.

5.1.1.4 - Rol de los sorbatos en la preservación de productos cárnicos

Como hemos visto, se han realizado numerosos estudios acerca de la acción antibotulínica de los sorbatos y su uso como sustituto del nitrito. Se ha podido ver así, que la combinación de sorbato de potasio y nitrito de sodio, además de inhibir el crecimiento del *C. botulinum*, inhibe el desarrollo de microorganismos mesófilos, psicrófilos y lipolíticos en tocino, en mayor grado que si se utiliza solamente nitrito de sodio (Ledward, 1981). Además, el sorbato de potasio inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de otros microorganismos que causan deterioro en productos cárnicos, en tocino almacenado al vacío (Pierson y col., 1981), en embutidos cocidos y en carnes procesadas. Leistner y col. (1978) encontraron que un 0,1 % de sorbato de potasio inhibía el desarrollo de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* en embutidos almacenados a 10 C.

La inmersión de embutidos fermentados y jamones en una solución al 10-20 % de sorbato de potasio inhibe el crecimiento de hongos y levaduras.

El sorbato de potasio también inhibe el desarrollo de bacterias (*Pseudomonas* spp, *B. thermosphacta*, *Lactobacillus* spp, *Enterobacteriaceae*) en carnes vacunas frescas (Greer, 1982; Zamora y Zaritzky, 1987, a y b).

En cuanto al uso del sorbato en carnes blancas, se ha reportado que, inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en pollo y pavo (Morad y col., 1982; Gray y col., 1984).

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosas patentes en las que se propone el uso de sorbato como antimicrobiano en combinación con otros aditivos para preservar productos cárnicos.

Vemos así que se han realizado numerosos estudios microbiológicos sobre el uso del sorbato en carnes. Sin embargo, la información acerca de su estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento es sumamente escasa.

5.1.2 - Reacciones de deterioro inducidas por la presencia de sorbatos y/o por sus productos de degradación

Durante el almacenamiento de las carnes de humedad intermedia se producen una serie de reacciones de deterioro (Ledward, 1981):

- * Oxidación de lípidos no saturados, que ocasiona un aumento de la rancidez, disminución de la solubilidad de las proteínas debido a su agregación, ruptura de proteínas y destrucción de determinados aminoácidos y vitaminas.

- * Pardeamiento no enzimático, que conduce a la formación de pigmentos pardos y genera compuestos volátiles.

- * Reacción de los componentes de la carne con componentes de la solución de infusión, que puede provocar un incremento en la degradación de proteínas.

Todas estas reacciones afectan negativamente la calidad organoléptica de la carne.

Webster y col. (1986) estudiaron el rol del sorbato y de distintos humectantes (cloruro de sodio, glicerol, sacarosa) sobre la destrucción del colágeno, la agregación de proteínas y el pardeamiento no enzimático en carnes de humedad intermedia (a_w 0,85) almacenadas a 38°C. Estos autores encontraron que en carnes cuya actividad de agua se deprimía por la adición de cloruro de sodio y/o glicerol, en presencia de sorbato de potasio, se producía una progresiva disminución de la cantidad de nitrógeno soluble, lo que indicaba un incremento en la agregación de las proteínas y el espectro típico de la carne cocida (picos a 540-640 nm) desaparecía más rápidamente en las muestras con sorbato, evidenciando la destrucción de hemoproteínas. Además, se observaba que la destrucción de colágeno era menor en presencia de sorbato. Por otra parte, en los sistemas estudiados, se registró la degradación del sorbato, lo cual confirmaría la participación de este preservador en las reacciones antes mencionadas.

En base a los resultados comentados, se concluye que, el sorbato o sus productos de degradación acelerarían la pérdida de calidad de carnes de humedad intermedia debido a su influencia en la agregación

de proteínas y en la degradación de hemoproteínas. La extensión de estas reacciones estaría influenciada por el humectante usado para deprimir la actividad de agua. Es también sabido que el sorbato participa en reacciones de pardeamiento no enzimático (Webster y col., 1985).

Es de destacar que, en ausencia de sorbato, a lo largo del almacenamiento, las reacciones antes mencionadas ocurren aunque, en algunos casos, en menor grado.

En relación a los resultados comentados, la destrucción de los sorbatos durante el procesamiento y/o almacenamiento puede llevar a concentraciones no efectivas para la estabilidad microbiológica. Además, debido a que los productos formados por su destrucción, participan activamente en reacciones de deterioro, la calidad nutricional y organoléptica del alimento se vería disminuida. Por estas razones, es de interés el estudio de la estabilidad de los sorbatos en carnes.

5.2 - OBJETIVOS

En este capítulo se estudiará la cinética de destrucción del sorbato de potasio en homogenatos cárnicos. Se analizará la influencia de las siguientes variables en ella:

- * Temperatura de almacenamiento acelerado y/o de procesamiento
- * pH
- * Sustancia usada para el control de pH
- * Humectante usado para ajustar la actividad de agua a 0,91
- * Cocción
- * Atmósfera de almacenamiento
- * Aditivos

En todos los casos se determinará la expresión cinética que permita cuantificar la destrucción del preservador, a fin de establecer cuáles son las variables que afectan su destrucción y encontrar las condiciones que aseguren su estabilidad química. Además se compararán los resultados con los obtenidos en sistemas acuosos para establecer la validez de los estudios sobre modelos.

5.3 - MATERIALES Y METODOS

Para la preparación de los homogenatos cárnicos se utilizó carne vacuna (*Biceps femoris*). Esta fue adquirida en un supermercado.

Los reactivos empleados en la preparación de los homogenatos cárnicos fueron todos de calidad analítica, con excepción de los polifosfatos que fueron grado alimenticio y fueron:

- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A).
- Acido ortofosfórico (Merck).
- Acido cítrico (Merck).
- Hidróxido de sodio (Merck).
- Cloruro de sodio (Mallinckrodt).
- Glicerol (Merck).
- Nitrito de sodio (Mallinckrodt).
- Sacarosa (Anedra).
- Acido ascórbico (Merck).
- Polifosfatos (Farmesa).

Los reactivos empleados para la cuantificación del sorbato de potasio fueron todos de calidad analítica y se detallan a continuación:

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Mallinckrodt).
- H_2SO_4 (96 % m/m, Merck): solución 2 N y 0,3 N
- $K_2Cr_2O_7$ (Merck): se disuelve 1,47 g en agua y se lleva a volumen final de 1000 ml.
- Na OH (97 % m/m, Merck): solución 0,5 N
- HCl, (37 % m/m), (Merck): solución 0,1 N
- Sorbato de potasio (Sigma, U.S.A): solución estándar.
- Acido tiobarbitúrico (Sigma, U.S.A): solución 0,5 % (m/v).

5.3.1 - Homogenatos cárnicos

A fin de evaluar en forma independiente los distintos parámetros que afectan la degradación del sorbato en homogenatos cárnicos, estos fueron formulados con la mecánica descripta a continuación.

Sobre un homogenato base (proporción carne/agua 90:10) que contenía 0,20 % (m/m) de sorbato de potasio y al que se deprimió la actividad de agua a 0,91 y se ajustó el pH a 5,0, se estudiaron los efectos de distintos valores de pH, distintos acidificantes, distintos humectantes y/o sus mezclas, distintos aditivos y diferentes atmósferas de almacenamiento.

5.3.1.1 - Composición de los homogenatos cárnicos

La composición de los homogenatos cárnicos se detalla en la Tabla 5.3.

Como primer paso en la formulación de los homogenatos cárnicos fue necesario determinar la cantidad de cada humectante requerida para lograr la depresión de la actividad de agua a 0,91. Estos cálculos se realizaron en forma análoga a la explicada al tratar el punto 4.3.2. Considerando, en este caso el aporte del agua contenida en la carne, el cual es de aproximadamente de 75 g agua/100 g de carne.

En los sistemas 1, 2, 3 y 4 la concentración de NaCl o glicerol adicionada corresponde a la requerida para deprimir la actividad de agua a 0,91 (Chirife y col., 1984). En los sistemas 5, 6, y 7 la concentración de NaCl es 3,50 % y se agregó la cantidad de glicerol necesaria para ajustar la actividad de agua a 0,91.

5.3.1.2 - Preparación de los homogenatos cárnicos

La carne vacuna (*Biceps femoris*) con un 8 % de grasa se desgrasó en forma manual para remover la grasa superficial. De esta forma el contenido de grasa se redujo a aproximadamente el 6,5 % (Montes, 1966). Luego, fue picada mediante una picadora de uso doméstico y se adicionó agua en la proporción indicada, sorbato de potasio, los humectantes y, según el caso, la mezcla de aditivos. Para asegurar una distribución adecuada de los componentes del sistema, éste se homogeneizó mediante el empleo de un homogeneizador Sorvall Omni Mixer (O.M.N.I corporation, U.S.A). Se ajustó el pH del sistema a 5,0 mediante el agregado de gotas de una solución de ácido ortofosfórico al 50 % (v/v) o mediante una solución de ácido cítrico al 50 % (m/v) (sistema 3, Tabla 5.3) o a 6,0 mediante el agregado de gotas de una solución saturada de NaOH.

A fin de determinar si el proceso de cocción de la carne afectaba la estabilidad del sorbato, el sistema 5 fue además preparado con carne cocida. El proceso de cocción se realizó en un baño de agua a 80 °C provisto con un termostato (Julabo, U.S.A). La carne, previamente desgrasada y picada fue colocada en un sobre del copolímero de cloruro de polivinilo y cloruro de polivinilideno (Cryovac CN530) perfectamente sellado. El mismo se colocó en el baño por 50 min. Una vez finalizado el proceso de cocción se enfrió la carne a 20 °C por inmersión en agua. Los subsiguientes pasos para la preparación del homogenato fueron idénticos a los descriptos en el párrafo anterior.

Tabla 5.3: Composición de los sistemas carnicos.

		Sistema						
% m/m	1	2	3*	4	5	6	7	
Carne	80,62	80,62	80,62	66,49	72,27	71,78	71,78	
Agua	9,75	9,75	9,75	7,39	8,03	7,97	7,97	
KS	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	
NaCl	9,50	9,50	9,50	----	3,50	3,50	3,50	
Glicerol	----	----	----	25,92	15,00	15,00	15,00	
N				----	----	----	0,008	
S						1,000	1,000	
AA						0,050	0,050	
PP	----	----	----	----	----	0,500	0,500	
pH	5,0	6,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Aw	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	

KS: sorbato de potasio; N: nitrito de sodio; S: sacarosa;

AA: ácido ascórbico; PP: polifosfatos.

*: acidificado con ácido cítrico.

Luego de preparados los sistemas, se tomaron alícuotas de 10,0 g y se colocaron en frascos de vidrio de 40 ml de capacidad, de manera tal que el espacio de cabeza fuera el mismo en todos los casos (75 % del volumen total del frasco). Los frascos se cerraron herméticamente para prevenir la evaporación y se envolvieron en papel aluminio para evitar la acción prooxidante de la luz. En el caso del sistema 5, en el que además se analizó el efecto de la atmósfera de almacenamiento sobre la estabilidad del sorbato, el aire contenido en el espacio de cabeza del frasco fue evacuado mediante una bomba de vacío y reemplazado por nitrógeno libre de oxígeno. Esta operación se realizó con una bolsa de purga de polietileno de alta densidad, marca Atmosbag (Sigma, U.S.A).

5.3.2 - Medición del pH

Para la determinación de pH se empleó un electrodo pinchacarne Ingold (Ingold, Frankfurt, Alemania) unido a un pHmetro Metrohm modelo E 632, previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. El error en la determinación del pH fue de 0,02 unidades de pH.

5.3.3 - Medición de la actividad de agua

La determinación de la actividad de agua de las muestras se realizó en un higrómetro Novasina Thermoconstanter Humidat TH2 (Novasina AG, C -8050 Zurich, Suiza) a temperatura constante de 25°C ± 0,05 °C. El procedimiento para calibrar el equipo fue el descrito en la sección 4.3.6.

Previo a la medición, las muestras fueron colocadas a 25 °C por un lapso de 6 horas con el objetivo de equilibrar su temperatura. Cada muestra se midió por duplicado.

El error de la determinación experimental de la a_w es de ± 0,005 unidades de a_w (Kitic y Col., 1986).

5.3.4 - Condiciones de almacenamiento

Los homogenatos cárnicos envasados se almacenaron por duplicado a 33, 45 y 57 °C (± 0,5 °C) y/o a 70, 80 y 90 °C (± 0,5 °C) en cámaras de temperatura constante y convección forzada (Memmert 854 Schabach, Alemania). A distintos intervalos de tiempo se retiraron muestras del almacenamiento y se colocaron a -20 °C hasta el momento de su análisis, ya que ensayos previos indicaron que prolongados lapsos de tiempo en dichas condiciones no producían pérdidas detectables en el contenido de sorbato de potasio.

5.3.5 - Determinación de sorbato de potasio

El contenido de sorbato de potasio se analizó mediante la técnica propuesta en la sección 3.2.1.5. En presencia de nitrito de sodio se aplicó la técnica de cromatografía líquida de alta presión cuya descripción se realizó en la sección 3.2.1.6. En todos los sistemas estudiados, las determinaciones se realizaron por duplicado y se informa el promedio obtenido.

5.3.6 - Análisis estadístico

El cálculo de las constantes cinéticas (k) y de las energías de activación (E_a) de la reacción de destrucción del sorbato se realizó por regresión lineal de los datos.

En todos los casos, se realizó un análisis de varianza y se calculó el coeficiente de determinación (R^2) con el objetivo de evaluar la significatividad de las regresiones.

Los errores asociados a los parámetros cinéticos se expresaron en base a la desviación estándar de los mismos.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las distintas constantes de velocidad y energías de activación se realizó un análisis de covarianza para la igualdad de pendientes cuyo resultado se comparó con el parámetro "F" para un nivel de confianza del 95 % (Sokal y Rohlf, 1969).

En cuanto a las energías de activación, cabe mencionar que, en el caso de tener datos a tres temperaturas, su cálculo se realizó tomando en cuenta dos valores de cada constante de velocidad, los cuales surgen de considerar el extremo superior e inferior del intervalo de confianza calculado en base al parámetro "t" para el 95 % de confianza. Este procedimiento es recomendado por Labuza y Kamman (1983) para disminuir el error y aumentar la certidumbre en el cálculo de las energías de activación cuando sólo se dispone de datos a tres temperaturas.

En el caso de disponer de datos a seis temperaturas, el cálculo de la energía de activación se realizó tomando en consideración el valor de la constante de velocidad obtenida a cada temperatura.

Todos los test utilizados se describen en el apéndice de "Procedimientos Estadísticos".

5.4 - RESULTADOS Y DISCUSION

5.4.1 - Parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato de potasio

De igual forma que en el caso de sistemas modelo acuosos, se analizó la retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento para obtener una expresión cinética que permita cuantificar la degradación.

En todos los sistemas estudiados la cinética de destrucción ajustó significativamente a orden uno. Este comportamiento está en concordancia con el observado en el caso de sistemas acuosos y es, en general, el reportado por otros autores para la destrucción de sorbatos en distintos alimentos tales como pasta de pescado y homogenatos de frutas (Vidyasagar y Arya, 1984; García y col., 1993; Corona, 1994). Sin embargo, en bibliografía no hay datos disponibles acerca de la cinética de destrucción de sorbatos en carnes.

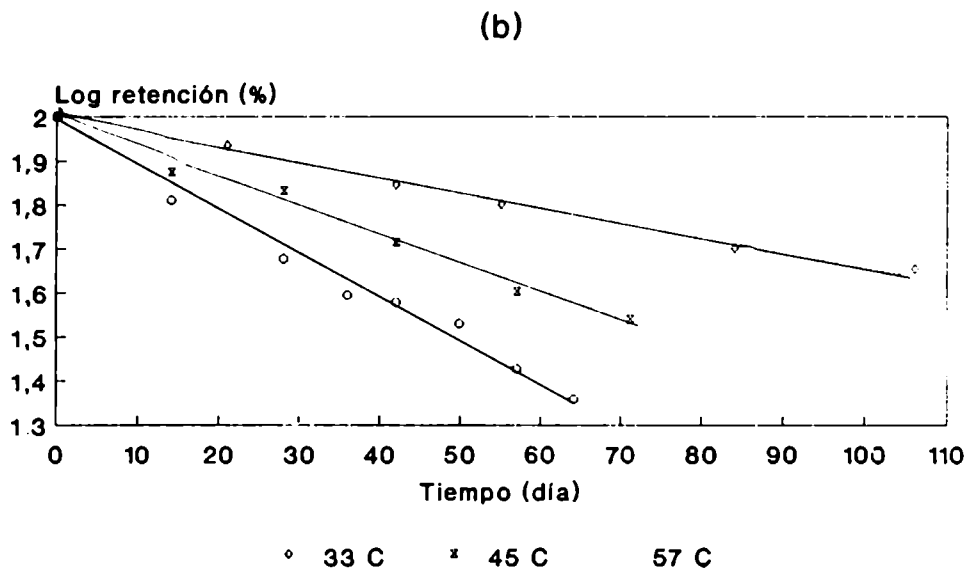
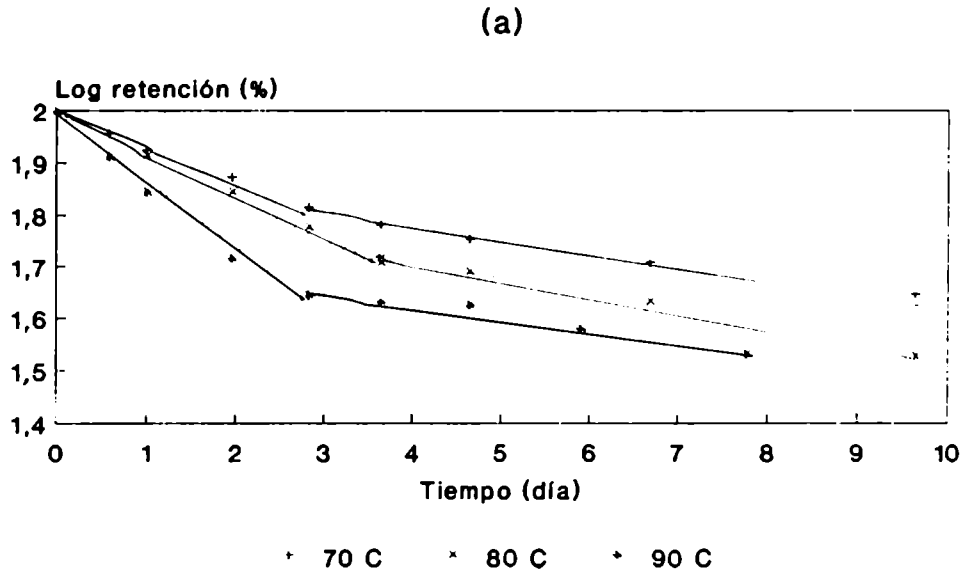
En los sistemas cárnicos sometidos a altas temperaturas (70, 80 y 90 °C) la velocidad de destrucción disminuyó después de 0,5-3 días de tratamiento térmico, observándose un cambio de pendiente (quiebre) en la representación del logaritmo del porcentaje de retención de sorbato de potasio en función del tiempo de almacenamiento (Figura 5.1).

Las constantes de velocidad de la reacción de destrucción mostraron una dependencia significativa con la temperatura tipo Arrhenius. En el caso de los sistemas sometidos a altas temperaturas (70, 80 y 90 °C), este comportamiento se observó solamente en la primer etapa de la reacción (previo al quiebre).

5.4.2 - Influencia de la temperatura

La Figura 5.1 a y b ilustra el efecto del tiempo y la temperatura sobre la retención de sorbato de potasio en homogenatos cárnicos de a_w 0,91 y pH 5,0 conteniendo NaCl y glicerol como humectantes. Como ya se comentó, en ella se aprecia que a 70, 80 y 90 °C la velocidad de destrucción disminuyó después de 0,5 - 3 días de tratamiento térmico, observándose un cambio de pendiente (Fig. 5.1 a). El mismo comportamiento ha sido reportado por Webster y col. (1986) en carnes de humedad intermedia al cabo de 25 días de almacenamiento a 38 °C y por Gerschenson y col. (1986) después de 50 días de almacenamiento, a 45°C, en soluciones acuosas de actividad de agua 0,94 que contenían glucosa y lisina y cuyo pH era 3,5 - 4,5.

Figura 5.1: Efecto de la temperatura sobre la retención de sorbato de potasio en homogenatos cárnicos de a_w 0,91 y pH 5,0 conteniendo NaCl y glicerol (sistema 5, Tabla 5.3)



El comportamiento de los homogenatos cárnicos puede ser explicado teniendo en cuenta dos factores:

1) La limitada difusividad del oxígeno en el caso del sistema cárnico. Durante el tratamiento térmico ocurre el agotamiento del oxígeno contenido en el homogenato cárnico. Es así que la difusión del oxígeno contenido en la cámara de aire es un paso indispensable para que continúe la autooxidación de los sorbatos. La resistencia a dicha difusión presentada por la matriz cárnica, produce un enlentecimiento de la destrucción por disminución de la concentración del oxígeno, reactivo indispensable.

2) El efecto protector de los compuestos formados por la reacción de Maillard sobre la oxidación de lípidos (Griffith y Johnson, 1957; Lingnert y Lundgren, 1980). Durante la degradación oxidativa del ácido sórbico se forman compuestos carbonílicos que reaccionan con los grupos amino libres presentes en la carne, vía reacción de Maillard formándose pigmentos pardos (Arya, 1980; Arya y Thakur, 1988). Estos compuestos se acumularían en el transcurso del tratamiento térmico y podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre la destrucción del sorbato, si se considera la similitud estructural de este preservador y los lípidos.

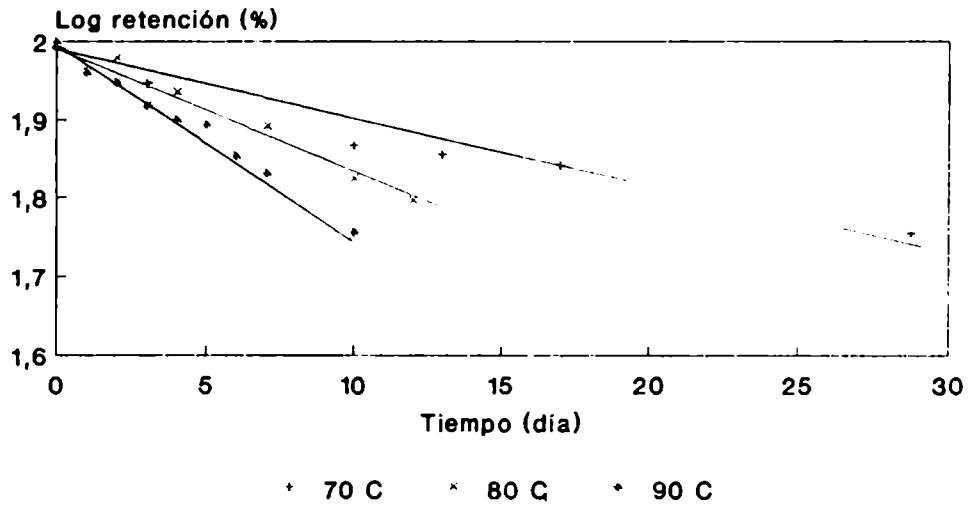
En los sistemas cárnicos almacenados a 33, 45 y 57 °C, la velocidad de la reacción de destrucción fue constante (Figura 5.1 b). Probablemente, en este rango de temperatura, la difusión de oxígeno no llegue a limitar la ocurrencia de la oxidación del preservador. Además, la formación de pigmentos pardos ocurre a menor velocidad y, por ende, no se registraría el efecto inhibitorio antes citado.

En la Figura 5.2, se aprecia que en el caso de un sistema acuoso de composición similar al sistema cárnico precitado (pH 5,0, a_w 0,91 deprimida por la adición de NaCl y glicerol y con una proporción de glicina igual a la presente en la carne vacuna), la velocidad de destrucción del sorbato de potasio fue constante, tanto en el rango de temperaturas de almacenamiento acelerado (33, 45 y 57 °C) como en el de temperaturas de procesamiento (70, 80 y 90 °C). Este diferente comportamiento estaría relacionado con la ausencia de la matriz histológica presente en el sistema cárnico, la cual introduciría una limitación en la difusión de oxígeno, así como un menor contenido de aminos activos en estos sistemas acuosos.

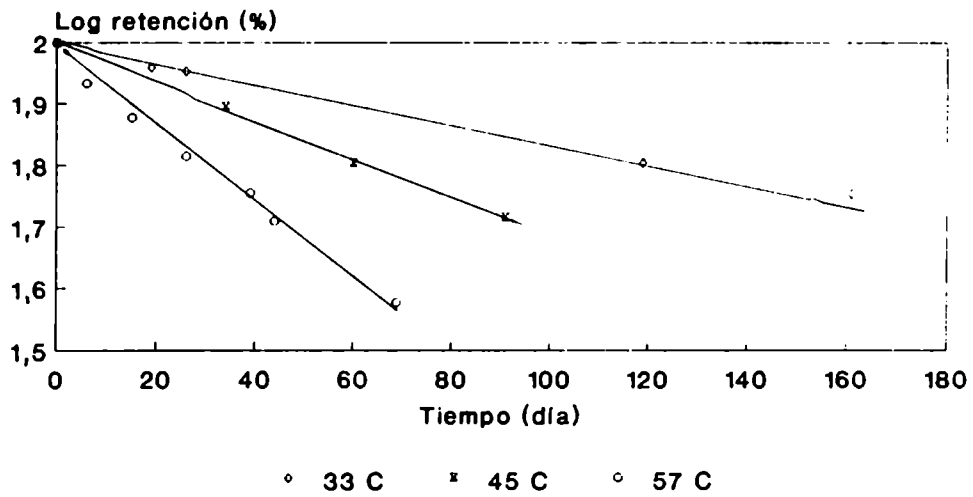
Como se mencionó previamente, la destrucción del sorbato, en los sistemas cárnicos, ajustó a una cinética de primer orden, tanto antes como después del cambio de pendiente. Sin embargo, es de destacar que previo al quiebre la destrucción del sorbato fue menor al 50 %. Este hecho aumenta la incertidumbre en el cálculo del orden de reacción (Labuza y Riboh, 1982).

Figura 5.2: Efecto de la temperatura sobre la retención de sorbato de potasio en sistemas modelo acuosos de a_w 0,91 y pH 5,0 conteniendo NaCl, glicerol y glicina.

(a)



(b)



Después del cambio de pendiente (Figura 5.1 a) no se observó un efecto claro del aumento de la temperatura sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato. Ello se muestra en la Tabla 5.4. Inclusive, en algunos casos, (sistema 5) se registró una disminución en la velocidad de reacción. Este comportamiento puede ser causado por el hecho de que un aumento de temperatura favorece, en mayor medida, el desarrollo de las reacciones de pardeamiento no enzimático que la destrucción del sorbato puesto que, la energía de activación de las reacciones de pardeamiento no enzimático es más elevada que la de la reacción de destrucción del sorbato (Buera y col., 1987; este trabajo, sistemas acuosos). En consecuencia, al elevarse la temperatura se incrementaría la concentración de pigmentos pardos que inhibirían la oxidación del sorbato. Además se produciría una disminución de la solubilidad del oxígeno en la matriz cárnica (Glasstone, 1952). Estos dos factores podrían enmascarar el efecto acelerante del incremento de temperatura sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato luego del quiebre.

En la Figura 5.3 se observa que el sistema cárnico que contiene NaCl y glicerol como humectantes presenta la misma dependencia con la temperatura en el rango de temperaturas de procesamiento (70, 80 y 90 °C; primer tramo) que en el de temperaturas de almacenamiento acelerado (33, 45 y 57 °C). Dado que no es frecuente que un alimento cárnico sea sometido a temperaturas en el rango de 70 - 90 °C por períodos de tiempo mayores de 0,5 a 3 días, se piensa que los datos obtenidos a esas temperaturas, antes del quiebre serían los de mayor valor a los fines del cálculo de la estabilidad de los sorbatos. Como ya se mencionó, los datos para ese período mostrarían la misma dependencia con la temperatura que los datos obtenidos en el rango 33 - 57 °C hecho que se había observado en el Capítulo 4 para sistemas acuosos (sistema 11, Tabla 4.3). No obstante, la energía de activación del sistema cárnico fue significativamente más elevada que la del sistema acuoso (Tablas 4.6 y 5.4). Esto indicaría una mayor sensibilidad de la reacción de destrucción del sorbato frente al cambio de temperatura cuando hay presente carne.

A partir de los resultados obtenidos, se puede estimar una retención de sorbato de potasio del 50 % al cabo de 100 días de almacenamiento a 33 °C de un sistema cárnico de pH 5,0 y a_w 0,91 ajustada con NaCl y glicerol. En la Tabla 5.5, se muestran, además, resultados similares que fueron obtenidos a 38 °C luego de 119 días de almacenamiento por Webster y col. (1986). A temperaturas de refrigeración (\approx 4 °C) Zamora y Zaritzky (1987, a) y Robach y col. (1980) reportaron retenciones de aproximadamente 100 % para carnes rojas y blancas almacenadas por períodos de 38 a 60 días. Probablemente, en estos trabajos no se hayan detectado pérdidas en el contenido de sorbato debido a las condiciones de almacenamiento empleadas (exclusión de oxígeno del envase y baja temperatura).

Tabla 5.4 : Constantes de la reacción de destrucción del sorbato a alta temperatura.

Sistema	Temp. (° C)	pH	Parámetro		
			3^{-1} (k ± d).10 (día) Primer etapa	3^{-1} (k ± d).10 (día) Segunda etapa	Ea ± d (Kcal/mol)
1 (carne/agua/KS/NaCl)	70	5.0	430, 2 ± 19, 1 abcd	39, 8 ± 5, 1 ABC	7 ± 2 ^a
	80		554, 3 ± 12, 5 efg	61, 0 ± 4, 3 A	
	90		769, 7 ± 26, 4 hijkl	65, 2 ± 4, 6 B	
2 (carne/agua/KS/NaCl)	70	6.0	142, 9 ± 6, 0 a	65, 2 ± 5, 8 G	18 ± 4 ^a
	80		524, 0 ± 8, 6	56, 5 ± 4, 5 C	
	90		672, 2 ± 11, 2 h	74, 1 ± 2, 7 C	
3 (carne/agua/KS/NaCl) acidificado con ac. citrico	70	5.0	184, 5 ± 4, 5 b	49, 4 ± 3, 8	10 ± 2
	80		240, 4 ± 3, 1 e	57, 0 ± 2, 4	
	90		441, 8 ± 9, 4 i	58, 7 ± 2, 5	
4 (carne/agua/KS/glicerol)	90	5.0	520, 7 ± 15, 8 jmn	52, 6 ± 4, 0	
5 (carne/agua/KS/NaCl/ glicerol)	70	5.0	147, 4 ± 5, 2 c	51, 6 ± 1, 9 D	10 ± 2
	80		181, 9 ± 3, 3 f	72, 6 ± 3, 4 DEG	
	90		334, 2 ± 9, 1 km	53, 7 ± 6, 47 E	
5 (carne/agua/KS/NaCl/ glicerol) preparado con carne cocida	70	5.0	158, 2 ± 4, 3 d	40, 6 ± 3, 9 F	
	80		184, 0 ± 4, 9 g	54, 1 ± 2, 2 G	
	90		340, 8 ± 14, 1 ln	53, 7 ± 2, 7 F	

KS: sorbato de potasio.

d: desviación estándar de la pendiente.

Las constantes de velocidad (k) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0, 95).

Las constantes de velocidad (k) de la primer etapa varían significativamente con la temperatura para cada sistema: por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.

Figura 5.3: Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad de la reacción de destrucción del sorbato de potasio en homogenatos cárnicos de a_w 0,91 y pH 5,0, conteniendo NaCl y glicerol.

Los datos de las constantes de velocidad empleadas para 70, 80 y 90 °C son los correspondientes a la etapa cinética previa al quiebre.

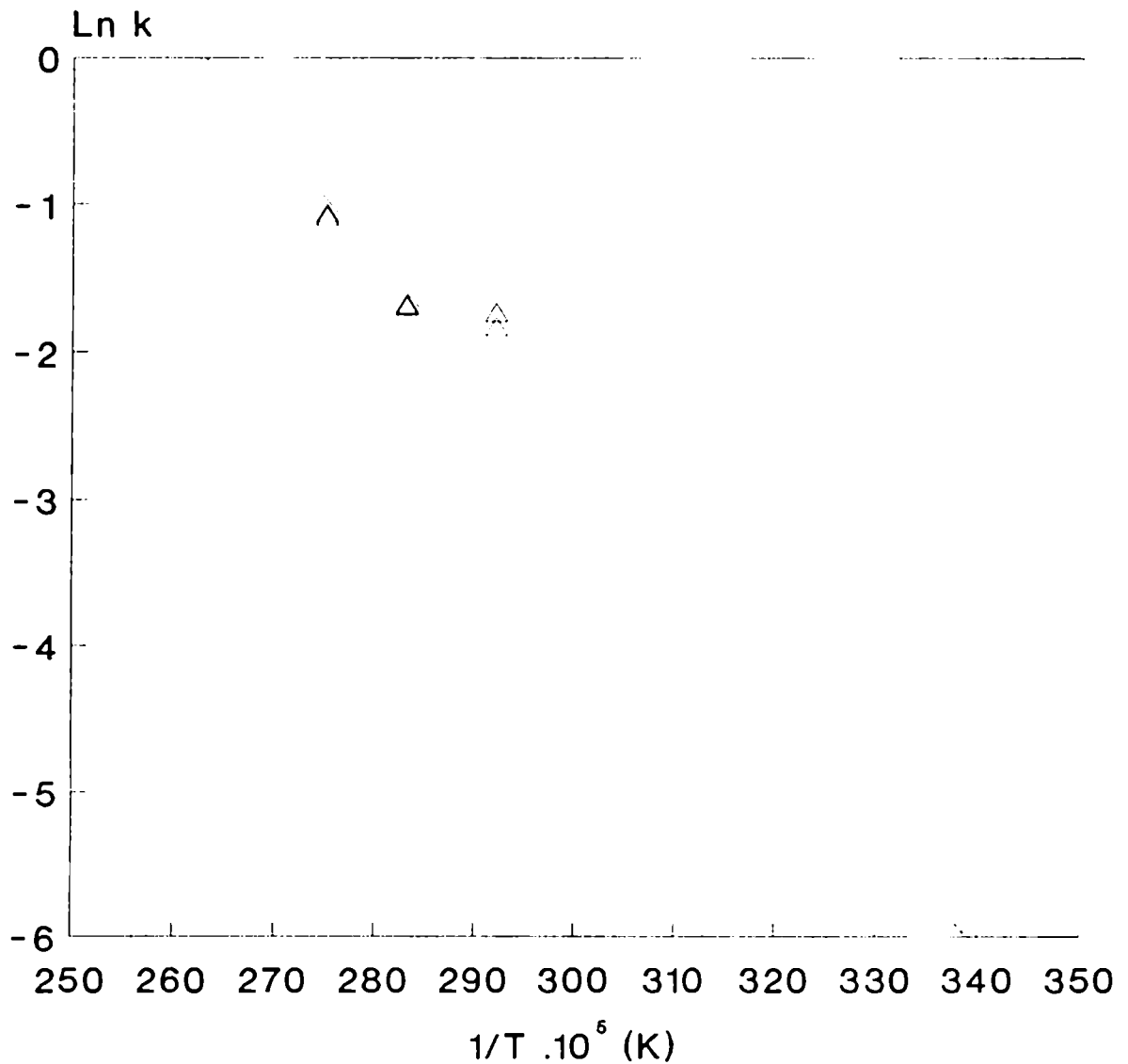


Tabla 5.5: Efecto de las condiciones de almacenamiento y de la composición del sistema en la retención de sorbatos.

Sistema	Temperatura de almacenamiento	Tiempo (día)	Retención (%)	Referencia
Carnes de humedad intermedia*	38 °C	119	50	Webster y col. (1986)
Carnes frescas almacenadas al vacío	4 °C	38	100	Zamora y Zaritzky (1987, a)
Sistema 5	33 °C	100	50	Este trabajo

* pH 5,5 ; a_w 0,85 por adición de NaCl y glicerol.

5.4.3 - Influencia de las otras variables analizadas

En todos los sistemas estudiados que fueron sometidos a temperaturas de procesamiento (70, 80 y 90 °C), luego de producido el quiebre, no se observó una tendencia clara de ninguna de las variables estudiadas (temperatura, pH, acidificante, humectante). Como se comentó previamente, el aumento de la concentración de pigmentos pardos con propiedades antioxidantes, así como la disminución de la solubilidad del oxígeno en la carne se contraponen al aumento de la velocidad de reacción conforme se eleva la temperatura. Probablemente estos y/u factores otros afecten la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato enmascarando los efectos de las distintas variables analizadas. La Figura 5.4 ilustra este comportamiento para varios sistemas estudiados. En ella se aprecia que el porcentaje de retención de sorbato de potasio al cabo de 5 días de tratamiento térmico a 90°C, es muy semejante en todos los casos y está alrededor del 50 %.

Debido a lo antedicho y a que el período abarcado por el primer tramo sería el de mayor importancia práctica, el análisis se centrará en el tramo previo al quiebre. Dichos datos se compararán con el sistema acuoso elegido como modelo (sistema 11 - Tabla 4.3) para el cual se dispone de información en el rango de temperaturas 33 a 90°C. Los datos posteriores al quiebre se informarán únicamente a fines ilustrativos.

Figura 5.4 : Porcentaje de retención de sorbato de potasio a los cinco días de almacenamiento a 90 °C para diversos sistemas.

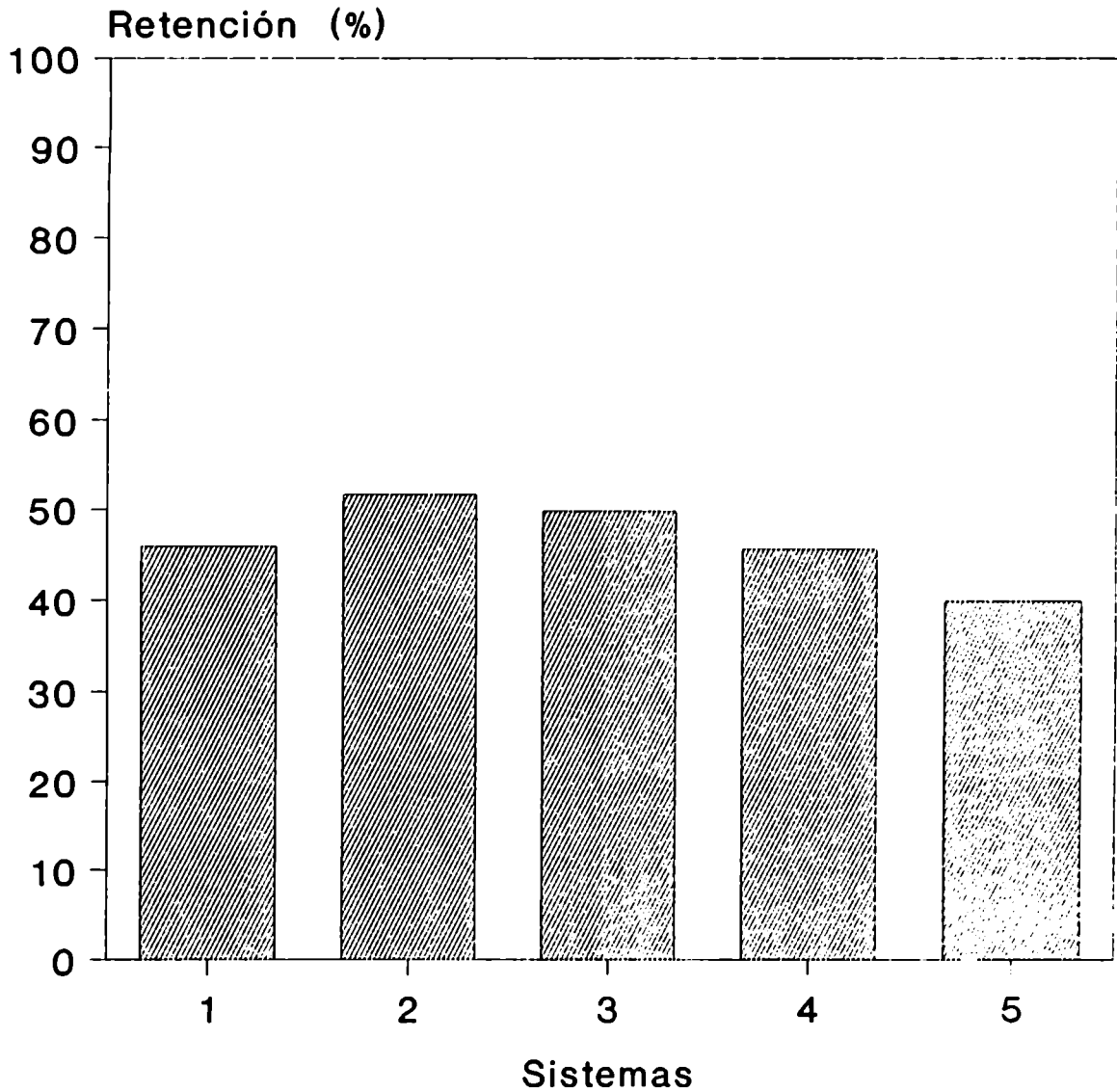
Sistema 1: carne, agua, sorbato de potasio y NaCl; pH 5,0.

Sistema 2: ídem 1 ; pH 6,0.

Sistema 3: ídem 1 ; acidificado con ácido cítrico a pH 5,0.

Sistema 4: carne, agua, sorbato de potasio y glicerol; pH 5,0.

Sistema 5: carne, agua, sorbato de potasio, NaCl y glicerol; pH 5,0.



5.4.3.1 - Influencia del pH

Distintos autores han reportado que, un aumento de pH produce una disminución en la velocidad de degradación del preservador (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1983; Gerschenson y col., 1986 y 1987; Guerrero, 1990). Este mismo efecto ha sido observado al trabajar con sistemas modelo acuosos (ver sección 4.4.4).

En la Tabla 5.6 se muestra el efecto del cambio de pH sobre la velocidad de destrucción en sistemas cárnicos. Como puede apreciarse, el efecto protector del aumento de pH se observa, en general, a altas temperaturas, en la primer etapa de la reacción.

Al igual que en el caso de sistemas acuosos (sección 4.4.4.1), el aumento de pH de 5,0 a 6,0 provoca un incremento en la energía de activación y, por ende, la sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura es mayor a pH 6,0.

El pH de todos los sistemas cárnicos fue monitoreado en función del tiempo a fin de analizar posibles problemas de estabilidad debido a su incremento durante el almacenamiento. En todos los homogenatos estudiados, el pH disminuyó ligeramente (0,5 unidades) a lo largo del almacenamiento. Para interpretar esto se debe considerar la ocurrencia de dos fenómenos opuestos. El primero de ellos es la marcada disminución de pH que se espera, conforme los grupos amino de la carne desaparecen, debido a su participación en reacciones de pardeamiento no enzimático (Obanu y Ledward, 1986). El segundo, es el incremento de pH que se observa en soluciones de sorbato debido a la oxidación de este último (Obanu y Ledward, 1986). En este caso, probablemente, como resultante de estos dos fenómenos opuestos, se observó una ligera disminución de pH.

5.4.3.2 - Influencia del acidificante

En la Tabla 5.7 se muestra el efecto del ácido usado para ajustar el pH del sistema a 5,0. En ella se aprecia que, en la primer etapa de la reacción a alta temperatura, el empleo de ácido cítrico en reemplazo de fosfórico produjo una menor velocidad de destrucción del preservador. El mismo comportamiento fue observado en sistemas acuosos (sección 4.4.5.1) y se concluyó que estaba relacionado con la mayor capacidad del ácido cítrico para complejar al hierro, dado que este metal, al estado libre, cataliza reacciones de oxidación.

En cuanto a la sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura, la adición de cítrico o fosfórico no produjo cambios en la misma ya que las energías de activación obtenidas no presentaron diferencias significativas.

Tabla 5.6: Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato de potasio.

Sistema	Temp. (° C)	pH	Parámetro		
			$(k \pm d) \cdot 10^3$ (día ⁻¹) Primer etapa	$(k \pm d) \cdot 10^3$ (día ⁻¹) Segunda etapa	E act. \pm d (Kcal/mol)
1 (carne/agua/KS/NaCl)	70	5.0	430, 2 \pm 19, 1 a	39, 8 \pm 5, 1	7 \pm 2
	80		554, 3 \pm 12, 5	61, 0 \pm 4, 3	
	90		769, 7 \pm 26, 4 b	65, 2 \pm 4, 6	
2 (carne/agua/KS/NaCl)	70	6.0	142, 9 \pm 6, 0 a	65, 2 \pm 5, 8	18 \pm 4
	80		524, 0 \pm 8, 6	56, 5 \pm 4, 5	
	90		672, 2 \pm 11, 2 b	74, 1 \pm 2, 7	

KS: sorbato de potasio.

d: desviación estándar de la pendiente.

Las constantes de velocidad (k) o las energías de activación (Ea) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0, 95).

Las constantes de velocidad (k) de la primer etapa varían significativamente con la temperatura para cada sistema; por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.

Tabla 5.7 : Efecto del ácido usado para regular el pH a 5.0 sobre los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato.

Sistema	Temp. (° C)	pH	Parámetro		
			$(k \pm d) \cdot 10^3$ (día ⁻¹) Primer etapa	$(k \pm d) \cdot 10^3$ (día ⁻¹) Segunda etapa	E act. \pm d (Kcal/mol)
1 (carne/agua/KS/NaCl)	70	5.0	430, 2 \pm 19, 1 a	39, 8 \pm 5, 1	7 \pm 2
	80		554, 3 \pm 12, 5 b	61, 0 \pm 4, 3	
	90		769, 7 \pm 26, 4 c	65, 2 \pm 4, 6	
3 (carne/agua/KS/NaCl) acidificado con ácido cítrico.	70	5.0	184, 5 \pm 4, 5 a	49, 4 \pm 3, 8	10 \pm 2
	80		240, 4 \pm 3, 1 b	57, 0 \pm 2, 4	
	90		441, 8 \pm 9, 4 c	58, 7 \pm 2, 5	

KS: sorbato de potasio.

d: desviación estándar de la pendiente.

Las constantes de velocidad (k) o las energías de activación (Ea) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0, 95).

Las constantes de velocidad (k) de la primer etapa varían significativamente con la temperatura para cada sistema; por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.

5.4.3.3 - Influencia del humectante usado para deprimir la actividad de agua

Como se aprecia en la Tabla 5.8, en la primer etapa de la reacción a alta temperatura, de todos los humectantes utilizados, el NaCl fue el que produjo la mayor velocidad de destrucción del sorbato y la mezcla de NaCl al 3,50 % (m/m) y glicerol fue la que produjo la menor velocidad de destrucción. El sistema que usó glicerol como humectante presentó a 90 °C un valor intermedio de velocidad específica. Ellis y col. (1968) informaron acerca del efecto prooxidante del NaCl sobre la oxidación de los ácidos grasos en carne de cerdo. Dado que la estructura química del ácido sórbico es similar a la de los ácidos grasos, se podría esperar el mismo efecto de esta sal sobre la oxidación del sorbato, explicando ello el efecto del NaCl en la destrucción.

En sistemas acuosos conteniendo glicina, las tendencias observadas fueron diferentes: la destrucción del sorbato fue mayor en presencia de glicerina que de NaCl. La mezcla de humectantes, presentó la menor velocidad de destrucción del preservador coincidiendo ello con lo observado en sistemas cárnicos.

El empleo de la mezcla de humectantes en sistemas cárnicos, determinó una energía de activación mayor que en presencia de NaCl. En sistemas acuosos de composición similar a los cárnicos, esa diferencia no fue observada.

Los resultados comentados indicarían que las tendencias obtenidas en sistemas modelo acuosos no son, en todos los casos, extrapolables a sistemas más complejos.

Por otra parte, las constantes de velocidad correspondientes a los sistemas cárnicos, cuando se usó la mezcla de humectantes, fueron significativamente mayores que en el caso de los sistemas acuosos. Esto indicaría que los componentes cárnicos desempeñan un rol importante sobre la reacción de destrucción de los sorbatos.

5.4.3.4 - Influencia de la cocción

Dado que los sorbatos se emplean como antimicrobianos tanto en carnes crudas como cocidas, se estudió si los cambios producidos por el proceso de cocción de la carne afectan la estabilidad del sorbato. Como se muestra en la Tabla 5.9, no se registraron diferencias significativas entre las constantes de velocidad del primer tramo obtenidas empleando carne cruda o cocida. Esto indicaría que los cambios producidos en la carne por el proceso de cocción tales como la desnaturalización de las proteínas, la fusión de la grasa y la destrucción de estructuras celulares (Lawrie, 1977), no afectan la velocidad de destrucción del sorbato.

Tabla 5.8: Efecto del humectante usado para deprimir la actividad de agua a 0,91 sobre los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato a pH 5,0.

Sistema	Temp. (°C)	Parámetro		
		3^{-1} (k ± d).10 (día) Primera etapa	3^{-1} (k ± d).10 (día) Segunda etapa	E act. ± d (Kcal/mol)
1 (carne/agua/KS/NaCl)	70	430,2 ± 19,1 a	39,8 ± 5,1	7 ± 2 a
	80	554,3 ± 12,5 b	61,0 ± 4,3	
	90	769,7 ± 26,4 cd	65,2 ± 4,6	
4 (carne/agua/KS/glicerol)	90	520,7 ± 15,8 de	52,6 ± 4,0	
5 (carne/agua/KS/NaCl/glicerol)	33	7,8 ± 0,3 f		16 ± 2 ab
	45	14,9 ± 0,8 g		
	57	21,8 ± 1,2 h		
	70	147,4 ± 5,2 ai	51,6 ± 1,9	
	80	181,9 ± 3,3 bj	72,6 ± 3,4	
	90	334,2 ± 9,1 cek	53,7 ± 6,47	
agua/KS/NaCl/gly	33	6,3 ± 0,3 l		8 ± 2
	45	11,5 ± 0,2 m		
	57	16,9 ± 0,3 n		
agua/KS/glicerol/gly	33	13,6 ± 0,3 l		7 ± 2
	45	21,1 ± 0,3 m		
	57	30,4 ± 1,3 n		
agua/KS/NaCl/glicerol/gly	33	3,5 ± 0,1 fl		10 ± 1 b
	45	7,2 ± 0,2 gm		
	57	13,4 ± 0,4 hn		
	70	18,8 ± 1,5 i		
	80	35,1 ± 1,5 j		
	90	53,8 ± 2,0 k		

KS: sorbato de potasio; gly: glicina.

d: desviación estándar de la pendiente.

Las constantes de velocidad (k) o las energías de activación (Ea) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

Las constantes de velocidad (k) de la primer etapa varían significativamente con la temperatura para cada sistema; por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.

Tabla 5.9: Efecto del proceso de cocción de la carne sobre la velocidad de destrucción del sorbato de potasio a pH 5, 0.

Sistema	Temp. (° C)	Constantes de velocidad	
		$(k \pm d) \cdot 10^3$ (día) Primer etapa	$(k \pm d) \cdot 10^{-1}$ (día) Segunda etapa
5 (carne/agua/KS/NaCl/ glicerol)	70	147, 4 ± 5, 2	51, 6 ± 1, 9
	80	181, 9 ± 3, 3	72, 6 ± 3, 4
	90	334, 2 ± 9, 1	53, 7 ± 6, 47
5# (carne/agua/KS/NaCl/ glicerol)	70	158, 2 ± 4, 3	40, 6 ± 3, 9
	80	184, 0 ± 4, 9	54, 1 ± 2, 2
	90	340, 8 ± 14, 1	53, 7 ± 2, 7

KS: sorbato de potasio.

#: preparado con carne cocida.

d: desviación estándar de la pendiente.

Las constantes de velocidad (k) de la primer etapa varían significativamente con la temperatura para cada sistema.

La velocidad de oxidación del sorbato está influenciada, entre otros factores, por la presión parcial de oxígeno, la cual está determinada por la cantidad de oxígeno disuelto en el sistema y por la extensión de la cámara de aire en envases impermeables.

Cuando se reemplazó por nitrógeno el aire de los envases conteniendo alícuotas del sistema 5, se observó que la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato a 33 °C era ligeramente menor (Figura 5.5). No obstante, el oxígeno disuelto en la carne fue suficiente para que procediese la destrucción del sorbato. Estos resultados indicarían que el almacenamiento a temperaturas habituales en países subtropicales y bajo atmósfera de nitrógeno no fue tan ventajoso como se esperaría. Bolin y col. (1980) al estudiar la destrucción del sorbato en ciruelas de alta humedad almacenadas a 21 y 32 °C durante 9 meses, encontró que las pérdidas de sorbato no presentaban diferencias significativas si el almacenamiento se realizaba en presencia de oxígeno o en atmósfera de nitrógeno y atribuyó dicho resultado a la imposibilidad de excluir totalmente el oxígeno de la matriz histológica que presentaban dichos frutos.

5.4.3.6 - Influencia de aditivos

La Tabla 5.10 ilustra el efecto de la adición de sacarosa, ácido ascórbico, polifosfatos y nitrito de sodio sobre la velocidad de la reacción de destrucción del sorbato a temperaturas de almacenamiento acelerado. En ella se observa que la adición conjunta de sacarosa, ácido ascórbico y polifosfatos no afectó la velocidad de reacción a 33 y 45 °C. Sin embargo, a 57 °C aceleró en forma significativa la destrucción del sorbato. En sistemas acuosos conteniendo NaCl, glicerol y glicina, la adición conjunta de sacarosa, ácido ascórbico y polifosfatos no afectó la velocidad de destrucción del sorbato a 57 °C.

Al agregar nitrito de sodio, en presencia de ácido ascórbico, sacarosa y polifosfatos, tanto en el sistema cárnico como en el acuoso, se observó que éste ejerce un efecto protector sobre la destrucción del sorbato. Recordemos que el ácido ascórbico reacciona con el nitrito de sodio según lo explicado en la sección 4.4.9.4.1, ejerciendo así la presencia conjunta de ambos un efecto protector sobre los sorbatos. Además, la adición de nitritos en carnes está asociada con el retardo del desarrollo de rancidez oxidativa (Robarts y Smart, 1974; Wasserman y Talley, 1972).

El agregado de los componentes de la sal de cura (sacarosa, ácido ascórbico, polifosfatos y nitrito de sodio), al sistema cárnico conteniendo NaCl y glicerol produjo un efecto diverso en la constante cinética, de acuerdo a la temperatura considerada. En sistemas acuosos, en cambio, dichos aditivos disminuyeron la velocidad de destrucción del preservador.

Figura 5.5: Retención de sorbato de potasio a 33 °C en homogenatos cárnicos conteniendo NaCl y glicerol

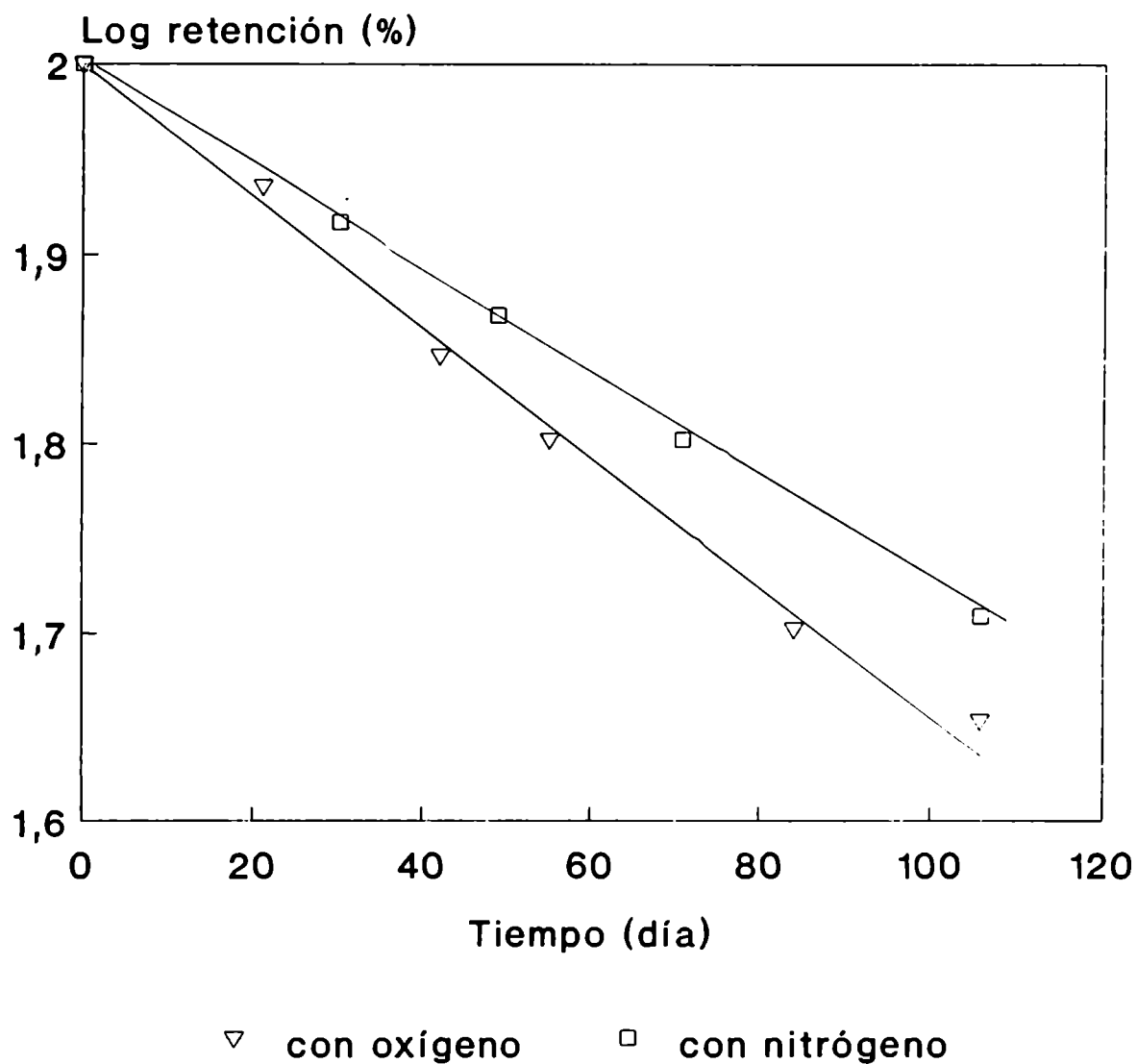


Tabla 5.10: Efecto de distintos aditivos sobre los parámetros cinéticos de la reacción de destrucción del sorbato a pH 5.0.

Sistema	Temp. (° C)	Parámetro	
		$(k \pm d) \cdot 10^3$ (día ⁻¹)	E act. \pm d (Kcal/mol)
5 (carne/agua/KS/NaCl/ glicerol)	33	7,8 \pm 0,3 ah	ab
	45	14,9 \pm 0,8 b	16 \pm 2
	57	21,8 \pm 1,2 cdi	
6 (carne/agua/KS/NaCl/ glicerol/S/AA/PP)	33	8,9 \pm 0,6 e	a
	45	15,5 \pm 0,2 f	11 \pm 1
	57	32,6 \pm 0,5 cgi	
7 (carne/agua/KS/NaCl/ glicerol/S/AA/PP/N)	33	5,4 \pm 0,4 ehk	
	45	14,1 \pm 0,4 fl	13 \pm 2
	57	26,9 \pm 1,6 gim	
*agua/KS/NaCl/glicerol/ gly	33	3,5 \pm 0,1 an	
	45	7,2 \pm 0,2 bo	bc
	57	13,4 \pm 0,4 dp	10 \pm 1
*agua/KS/NaCl/glicerol/ gly/S/AA/PP	57	13,7 \pm 1,3 jq	
*agua/KS/NaCl/glicerol/ gly/S/AA/PP/N	33	0,80 \pm 0,1 kn	c
	45	2,3 \pm 0,2 lo	17 \pm 7
	57	6,3 \pm 0,2 mpq	

KS: sorbato de potasio; S: sacarosa; AA: ácido ascórbico

PP: polifosfatos; N: nitrito de sodio.

d: desviación estándar de la pendiente.

Las constantes de velocidad (k) o las energías de activación (Ea) con la misma letra presentan diferencias significativas (P: 0,95).

Las constantes de velocidad (k) varían en forma significativa con la temperatura para cada sistema: por ello no se usaron letras "en este caso" para marcar dichas diferencias.

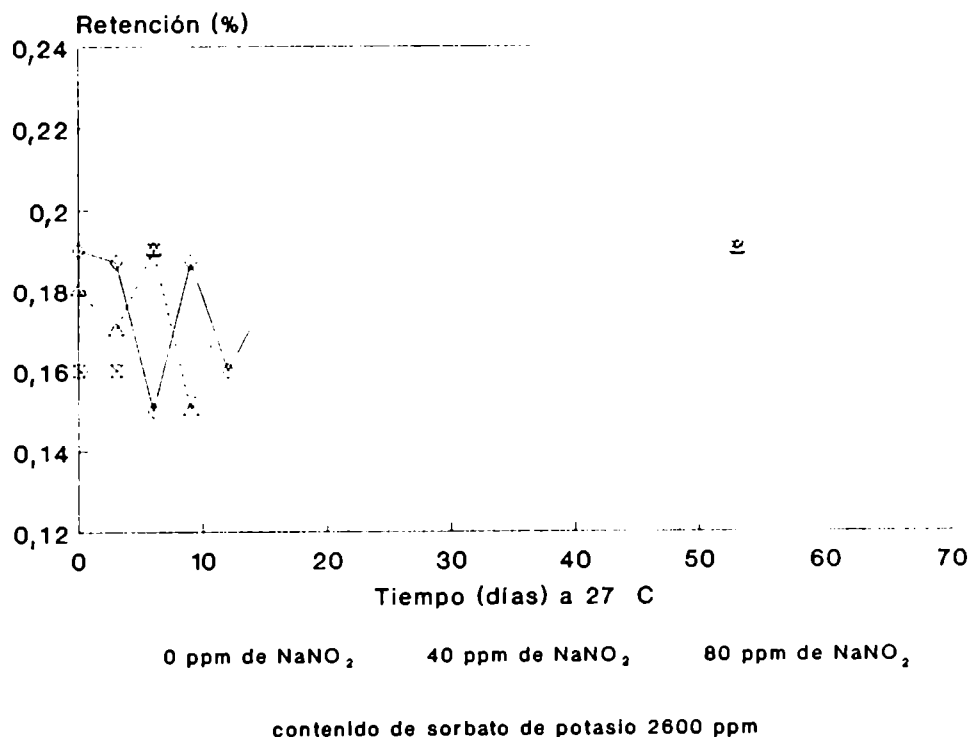
* ver sección 4.4.9.7

La energía de activación del sistema cárnico no se modificó significativamente al agregar todos los aditivos precitados. En cambio, dicho agregado aumentó ese parámetro cinético para el sistema acuoso estudiado.

Robach y col. (1980) y Sofos y col. (1980) realizaron estudios sobre la estabilidad del sorbato en carnes curadas. Los resultados obtenidos por Sofos y col. se muestran en la Figura 5.6. En la misma se aprecia que a lo largo del almacenamiento se produjeron notorias fluctuaciones en el contenido de sorbatos. Este hecho no permitió efectuar comparaciones entre sus datos y los obtenidos en este trabajo.

El estudio de la destrucción de sorbatos en alimentos es así un campo inexplorado. Pese a la dificultad que éste involucra, es importante avanzar en este terreno dado que el uso de sistemas modelo no siempre es útil, según lo aquí demostrado.

Figura 5.6: Efecto de la temperatura y de la concentración de nitrito de sodio sobre la retención de sorbato de potasio en tocino almacenado al vacío (Sofos y col., 1980)



5.5 - CONCLUSIONES

En base al estudio de la cinética de destrucción del sorbato de potasio en sistemas cárnicos, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

* En todos los sistemas cárnicos estudiados, la reacción de destrucción del sorbato de potasio ajustó a una cinética de primer orden, al igual que en el caso de sistemas modelo acuosos.

* La dependencia de las constantes de velocidad de la reacción de destrucción del sorbato en la primer etapa de la reacción a alta temperatura, así como las obtenidas a bajas temperaturas, ajustaron al modelo de Arrhenius.

* En los sistemas cárnicos sometidos a temperaturas de procesamiento (70, 80 y 90 °C), se produjo una disminución en la velocidad de reacción al cabo de 0,5 - 3 días de almacenamiento. Este comportamiento obedecería a que conforme transcurre el almacenamiento, disminuye la disponibilidad de oxígeno. Ello se debería al agotamiento del aire contenido en la matriz cárnica y a la resistencia que presenta dicha matriz a la difusión del oxígeno. Paralelamente a esto, los compuestos carbonílicos formados por las reacciones de pardeamiento no enzimático se acumularían ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la destrucción del sorbato y, por ende, disminuyendo la velocidad de destrucción.

En los sistemas cárnicos sometidos a temperaturas de almacenamiento acelerado (33, 45 y 57 °C), la velocidad de destrucción fue constante. Ello indicaría que, a menor temperatura, la difusión del oxígeno, no constituiría una limitación a la reacción de autooxidación y/o que el efecto inhibitorio de los productos de las reacciones de pardeamiento no enzimático sería de menor magnitud que a las mayores temperaturas, probablemente por la menor velocidad de formación de los mismos.

En sistemas acuosos de composición similar a los sistemas cárnicos, la velocidad de destrucción fue constante, tanto en el rango de altas como de bajas temperaturas. Este comportamiento diferente, estaría asociado con la presencia de una matriz en el sistema cárnico, lo cual introduciría una limitación en cuanto a la difusión de oxígeno así como a la complejidad de la composición química del sistema real.

* En presencia de NaCl y glicerol como humectantes, la dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura fue la misma, tanto en el rango de baja (33 - 57 °C) como de alta temperatura (70 -

90 °C) previo al quiebre. El mismo comportamiento se observó en el caso de un sistema acuoso de similar composición. Sin embargo, en presencia de carne, la sensibilidad de la reacción frente al cambio de temperatura fue mayor.

* En el rango de alta temperatura, luego del cambio de pendiente, no se observó un efecto claro de ninguna de las variables estudiadas (temperatura, pH, acidificante, humectante, etc.).

* En el rango de alta temperatura, antes del quiebre, se observó que el aumento de pH y el empleo de ácido cítrico en lugar de fosfórico ejercieron un efecto protector sobre la destrucción del preservador. En sistemas modelo acuosos se habían registrado las mismas tendencias.

* En el rango de alta temperatura, antes del quiebre, el NaCl fue el humectante que produjo una mayor velocidad de destrucción del preservador. Este efecto estaría asociado a la acción prooxidante de esta sal sobre los ácidos grasos. En sistemas acuosos, el NaCl ejerció, en cambio, un cierto efecto protector sobre la destrucción.

El empleo de la mezcla de NaCl (3,50 %) y glicerol como depresores de la actividad de agua, produjo la menor velocidad de destrucción del preservador en sistemas cárnicos así como en los acuosos conteniendo glicina.

La adición de glicerol como humectante determinó una velocidad de destrucción del preservador mayor que la producida por la mezcla de humectantes y menor que la generada por el NaCl. En sistemas acuosos, en cambio, el glicerol fue el humectante que produjo la mayor velocidad de destrucción.

* La velocidad de destrucción del sorbato en los sistemas cárnicos fue significativamente mayor que en sistemas acuosos de similar composición, lo que indicaría que los componentes de la carne desempeñarían un rol importante sobre la destrucción del sorbato.

* Los cambios producidos en la carne durante el proceso de cocción no afectaron la velocidad de destrucción del sorbato a altas temperaturas antes del quiebre.

* El almacenamiento en atmósfera de nitrógeno disminuyó ligeramente la velocidad de destrucción del sorbato a 33 °C. No obstante, el oxígeno disuelto en la matriz cárnica fue suficiente para que procediese la autooxidación. Esto indicaría que, si no es posible eliminar el oxígeno ocluido en la carne, el almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno no evitaría la oxidación del preservador.

* La presencia conjunta de sacarosa, ácido ascórbico y polifosfatos, a 33 y 45 °C, no afectó la velocidad de reacción. A 57 °C, en cambio aumentó la misma.

* El nitrito de sodio disminuyó la velocidad de destrucción del sorbato, cuando se adicionó en presencia de sacarosa, ácido ascórbico y polifosfatos. Igual tendencia se observó en sistemas acuosos.

* Los resultados obtenidos en sistemas acuosos no fueron, en todos los casos, extrapolables a un sistema de mayor complejidad como es un homogenato cárnico. El mismo es, a grandes rasgos, una matriz viscoelástica rica en componentes que pueden interactuar con el sorbato y/o con otros constituyentes presentes en los sistemas estudiados y que no es posible modelar completamente mediante un sistema acuoso.

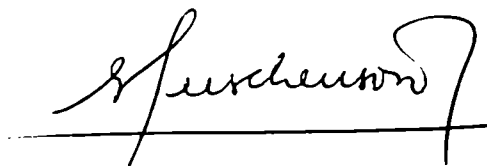
* Se puede decir que, en la formulación de productos cárnicos a los que se adiciona sorbato de potasio, se deben considerar las distintas variables que influyen sobre su destrucción (pH, acidificante, sustancia usada para regular la actividad de agua, presencia de otros aditivos, temperatura de almacenamiento) si se desea asegurar la estabilidad microbiológica de dichos productos. Los resultados expuestos permiten establecer algunas pautas para minimizar la oxidación de este preservador y, de esta forma, evitar las reacciones de deterioro inducidas por su destrucción.

6. CONCLUSIONES GENERALES

En la destrucción de los sorbatos se ha comprobado la influencia de algunas variables del sistema y del proceso: actividad de agua, humectante usado, pH, acidificante usado, otros aditivos presentes, temperatura de almacenamiento, etc. A modo de ejemplo cabe recordar que la vida media del preservador, en un sistema acuoso almacenado a 57 °C, empleando ácido cítrico para regular el pH a 5,0, fue de 101 días; en cambio, empleando ácido ortofosfórico la vida media se redujo a 48 días.

Se ha verificado la gran vinculación existente entre la destrucción de los sorbatos y el pardeamiento no enzimático, lo que marca la importancia de evitar dicha degradación en pro de la estabilidad microbiológica, nutricional y organoléptica de los alimentos que contienen este preservador.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer ciertas pautas para la selección de las condiciones para la formulación, procesamiento y almacenamiento de alimentos preservados, por métodos que involucren el agregado de sorbato de potasio, a fin de minimizar la destrucción de este preservador.



7. TABLAS DE DATOS

- 1 - Degradación de sorbato de potasio en sistemas modelo acuosos, p. 283
- 2 - Pardeamiento no enzimático en sistemas modelo acuosos, p. 294
- 3 - Degradación de sorbato de potasio en homogenatos cárnicos, p. 305

1 - Degradación de sorbato de potasio en sistemas modelo acuosos

A continuación se detallan los datos obtenidos en el estudio de la degradación del sorbato de potasio en sistemas modelo acuosos. El tiempo se expresó en días. Para todos los casos, salvo que se indique lo contrario, el envase empleado fue de vidrio.

Sistema 1					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
33,92	96,6	33,92	93,0	24,02	94,8
63,03	92,1	63,03	89,0	33,92	89,6
124,92	85,3	93,00	84,3	91,81	74,7
151,90	82,2	151,90	75,7	124,92	67,2
167,75	80,7			157,00	62,5
				178,00	56,0

Temp. 57 °C
(almacenado en frascos de polietileno)

tiempo	% retención
0,00	100,0
19,90	79,1
26,91	72,8
34,05	60,5
42,06	55,0
48,84	54,2

Sistema 2					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
43,00	95,5	43,00	95,7	33,00	99,0
85,00	95,7	76,00	95,9	75,00	98,0
144,00	96,2	120,00	105,0	120,00	99,0
169,00	93,1	160,00	91,1	160,00	98,0
200,00	97,0	202,00	93,0	202,00	96,0

Sistema 3

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
33,92	95,0	33,92	95,6	33,92	82,9
91,81	86,7	63,03	88,5	91,81	52,2
124,92	83,7	91,81	80,9	124,92	47,6
151,90	80,5	124,92	68,5	151,90	34,7
		151,90	67,9	167,79	32,1
		167,79	61,0		

Sistema 4

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
42,00	93,1	42,00	91,0	31,04	97,6
61,05	96,2	85,00	98,0	61,05	94,0
85,00	97,6	126,00	93,1	92,19	88,0
93,76	92,2	168,00	92,0	122,19	82,5
168,00	100,0	210,00	96,1	159,02	81,6
210,00	88,4				

Sistema 5

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
16,00	98,0	16,00	92,0	16,00	95,0
34,00	93,0	34,00	100,0	34,00	96,0
49,00	97,0	49,00	91,0	49,00	95,0
68,00	100,0	68,00	95,0	68,00	91,0
89,00	90,0	89,00	98,0	89,00	94,0
110,00	94,6	110,00	90,0	110,00	98,0
131,00	95,1	131,00	97,8	131,00	91,0

Sistema 6

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
16,00	98,0	16,00	92,0	16,00	95,0
34,00	93,0	34,00	10,0	34,00	96,0
49,00	97,0	49,00	91,0	49,00	95,0
68,00	100,0	68,00	95,0	68,00	91,0
89,00	90,0	89,00	98,0	89,00	94,0
110,00	94,6	110,00	90,0	110,00	98,0
131,00	95,1	131,00	98,0	131,00	91,0

Sistema 7

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
18,04	99,5	18,04	99,0	18,04	99,0
35,04	99,5	35,04	100,0	35,04	100,0
50,00	98,1	50,00	100,0	50,00	100,0
67,00	99,0	67,00	97,1	67,00	99,5
88,05	99,8	88,05	97,3	88,05	81,9
109,00	98,8	109,00	93,0	109,00	66,0
130,00	92,2	130,00	93,1	151,00	39,4
		151,00	92,2		

Sistema 8

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
17,00	89,1	17,00	94,2	17,00	99,8
34,00	98,4	34,00	98,9	34,00	98,4
49,00	99,3	49,00	98,4	49,00	94,6
66,00	97,5	66,00	96,4	66,00	99,3
87,00	100,0	87,00	97,1	87,00	97,1
108,00	89,4	108,00	100,0	108,00	97,5
129,00	100,0	129,00	100,0	129,00	90,4
				150,00	94,4

Sistema 9

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
6,00	94,6	6,00	93,3	3,00	92,9
15,00	86,3	15,00	85,4	10,00	83,0
32,08	80,5	38,00	66,7	24,93	61,6
49,92	68,9	49,92	58,3	32,08	58,3
70,97	64,0	69,00	46,0	39,99	50,1
80,85	58,6	75,96	41,7		
96,00	53,7				

Sistema 10

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
5,00	93,9	12,00	78,0	3,00	87,9
10,00	88,1	15,00	73,2	7,00	76,6
15,00	81,2	18,00	69,2	10,00	68,7
25,00	72,2	28,00	55,2	14,00	64,5
30,00	65,9			18,00	55,7
35,00	62,6			24,00	47,3

Sistema 11

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
19,00	91,2	34,00	78,6	6,00	85,8
26,00	89,9	60,00	63,8	15,01	75,4
119,00	63,7	91,00	52,1	26,00	65,3
161,00	56,7			39,00	56,8
				44,00	51,2
				68,83	37,7
				80,04	32,8

Continuación sistema 11

Temp. 70 °C		Temp. 80 °C		Temp. 90 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
3,00	88,6	2,00	95,2	1,00	91,5
10,00	73,6	4,00	86,4	2,00	89,0
13,00	71,6	7,04	78,0	3,00	82,9
17,00	69,3	10,00	66,8	4,00	79,7
20,00	65,3	12,00	62,6	5,00	78,4
24,00	59,6	14,00	60,6	6,00	71,3
28,75	56,8	17,00	55,7	7,04	67,8
		19,00	52,6	10,00	57,1

Temp. 57 °C
(almacenado en frascos de polietileno)

tiempo	% retención
0,00	100,0
5,96	82,1
10,94	65,4
17,93	57,3
25,80	48,1
32,00	41,7

Sistema 12

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
11,02	99,0	11,02	94,5	11,00	93,5
19,07	98,0	19,07	92,3	19,00	86,1
29,11	95,3	29,11	89,3	28,00	78,1
53,13	92,0	39,00	81,4	30,00	77,4
79,00	87,4	43,00	80,7	36,00	72,7
		60,00	74,7	45,00	65,4
		121,00	55,3	53,13	59,2
				78,00	41,5

Sistema 13

Temp. 57 °C

tiempo	% retención
0,00	100,0
10,94	85,6
20,97	78,4
32,00	76,3
41,93	76,2
52,88	67,0
62,81	64,2

Sistema 14

Temp. 33 °C

Temp. 45 °C

Temp. 57 °C

tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
20,42	93,9	20,42	88,3	20,42	80,5
35,00	89,8	41,42	77,2	41,42	63,3
83,00	78,9	64,92	72,5	64,92	48,8
106,00	76,0	106,00	63,0	84,00	38,3
141,00	67,0	126,00	55,3	105,00	31,7
		148,16	49,0	127,00	27,1

Sistema 15**Sistema 16****Sistema 17**

Temp. 57 °C

Temp. 57 °C

Temp. 57 °C

tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
22,00	76,9	21,06	74,1	21,06	73,8
44,13	61,7	41,92	62,5	41,92	66,6
65,99	56,1	84,00	39,4	62,92	49,5
90,83	35,6	105,00	29,9	84,00	40,6
107,97	31,8	127,00	24,3	105,00	32,9
				127,00	25,4

Sistema 18

Temp. 57 °C

Temp. 57 °C
(almacenado en polietileno)

tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0
22,97	60,4	6,00	82,4
43,17	43,1	13,04	70,0
63,88	33,5	19,90	59,3
104,00	17,4	34,05	46,9
		48,84	34,5

Sistema 19

Temp. 33 °C

Temp. 45 °C

Temp. 57 °C

tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
44,00	90,5	21,00	96,8	21,00	94,9
70,00	97,2	44,00	97,2	44,00	91,5
92,00	96,4	92,00	93,5	70,00	92,7
112,00	98,1	109,00	92,1	92,00	95,8
141,00	96,2	141,00	97,6	169,00	95,3
169,00	97,0			190,00	93,1
190,00	94,5				

Sistema 20

Temp. 33 °C

Temp. 45 °C

Temp. 57 °C

tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
21,00	96,7	21,00	94,9	21,00	96,0
64,00	92,3	42,00	96,2	42,00	97,0
84,00	92,5	64,00	95,3	64,00	94,9
105,00	91,6	84,00	92,5	84,00	93,0
149,00	98,4	105,00	90,7	128,00	92,1
175,00	91,7	128,00	91,5	149,00	99,0
		149,00	97,1	173,00	95,7

Sistema 21

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
20,42	94,3	20,42	100,0	20,42	100,3
41,42	96,0	41,42	97,6	41,42	96,2
64,92	93,9	64,92	93,8	64,92	90,4
106,00	98,6	106,00	93,9	106,00	82,7
127,08	99,5	127,08	99,0	127,08	78,4
148,16	100,0	148,16	98,1	148,16	72,3

Sistema 22

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
44,94	98,6	44,94	93,4	44,94	90,8
62,94	90,8	62,94	97,5	62,94	86,4
104,00	92,1	104,00	90,8	104,00	76,0
124,92	95,4	124,92	93,8	124,92	72,0
170,00	99,9	170,00	91,4	170,00	58,9

Sistema 23

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
28,00	97,4	28,00	98,7	28,00	99,2
57,00	92,2	57,00	97,0	57,00	94,0
84,00	91,5	84,00	91,6	84,00	96,0
112,00	93,0	112,00	95,0	112,00	96,4
175,00	92,0	175,00	92,4	175,00	97,7
208,00	96,4	208,00	98,1	208,00	99,9

Sistema 24		Sistema 25		Sistema 26	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
15,01	58,6	6,07	82,9	6,07	94,8
27,04	43,4	16,09	67,2	16,09	84,0
37,97	37,6	23,02	64,1	23,02	78,6
48,81	26,5	30,06	57,6	74,00	50,4
57,73	21,0	37,05	52,0	81,00	42,1
		74,00	30,1		
		81,00	27,1		

Sistema 27		Sistema 28		Sistema 29	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
14,00	80,6	14,00	74,6	14,88	75,1
27,85	69,2	27,85	54,4	26,81	68,6
36,77	62,9	36,77	46,5	35,73	59,0
47,88	59,0	47,88	39,4	46,83	55,7
59,08	54,9	59,08	32,5	58,83	47,5
70,08	49,7	70,08	25,9	69,04	41,2
79,07	42,1				

Sistema 30	
Temp. 57 °C	
tiempo	% retención
0,00	100,0
14,88	69,2
26,81	61,5
35,73	57,0
46,83	50,2
58,83	41,7

Sistema 31

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
42,79	76,5	7,00	86,7	7,01	79,9
63,85	67,5	17,84	69,9	10,81	72,3
81,01	61,0	24,75	62,5	14,12	69,8
105,99	54,7	31,97	55,0	17,77	65,5
126,83	48,8	45,82	42,8	21,13	59,4
				24,75	55,5
				28,06	50,5
				31,97	48,3

Sistema 32**Sistema 33****Sistema 34**

Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
7,01	79,5	7,01	80,1	7,07	80,9
14,12	69,0	14,12	69,3	21,00	61,1
21,13	59,0	21,13	60,8	28,05	51,9
28,06	50,5	28,06	51,8	35,15	45,6
		42,05	35,2	42,00	38,0

Sistema 35**Sistema 36****Sistema 37**

Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
14,14	75,7	7,07	94,7	13,87	74,6
28,05	66,5	14,14	93,0	28,07	62,3
42,08	50,5	21,00	86,1	42,15	49,0
56,14	42,9	28,05	81,8	56,18	38,7
70,11	37,2	35,15	76,2		
		42,08	74,0		
		49,14	71,9		

Sistema 38		Sistema 39	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0
14,08	87,5	13,87	85,6
28,07	84,0	28,07	80,3
43,07	78,6	42,15	71,4
56,89	72,4	56,18	62,3
75,00	62,5	69,15	55,3

Sistema 40					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
9,78	97,3	16,78	95,2	9,77	93,1
55,99	93,8	38,82	89,7	14,08	93,1
91,00	92,6	55,99	85,1	27,77	87,1
111,97	91,3	73,99	85,6	28,07	87,1
142,75	88,6	90,98	80,3	43,07	77,5
200,92	83,2			46,90	74,3
				56,89	68,6
				66,88	66,9

2 - Pardeamiento no enzimático en sistemas modelo acuosos

A continuación se detallan los datos obtenidos en la evaluación de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo de almacenamiento para sistemas modelo acuosos. El tiempo se expresó en días. Para todos los casos, salvo que se indique lo contrario, el envase empleado fue de vidrio.

Sistema 1					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
63,03	0,03	33,92	0,04	33,92	0,13
124,92	0,04	63,03	0,09	63,03	0,24
151,90	0,06	91,81	0,13	91,81	0,37
		151,90	0,21	124,92	0,51

Sistema 2					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
43,00	0,00	43,00	0,00	33,00	0,00
85,00	0,00	76,00	0,00	75,00	0,00
44,00	0,00	120,00	0,00	120,00	0,00
169,00	0,00	160,00	0,00	160,00	0,00
200,00	0,00	202,00	0,00	202,00	0,00

Sistema 3					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33,92	0,00	33,92	0,01	18,00	0,05
63,03	0,01	63,03	0,05	33,92	0,15
91,81	0,02	124,92	0,17	91,81	0,68
151,90	0,04	151,90	0,21	151,90	1,22
167,65	0,05	167,79	0,22	167,79	1,40

Sistema 4

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
42,00	0,00	42,00	0,00	31,04	0,03
61,05	0,00	85,00	0,00	60,05	0,04
85,00	0,00	126,00	0,00	122,97	0,07
93,76	0,00	168,00	0,00	159,02	0,10
168,00	0,00	210,00	0,00		

Sistema 5

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16,00	0,00	16,00	0,00	16,00	0,00
34,00	0,00	34,00	0,00	34,00	0,00
49,00	0,00	49,00	0,00	49,00	0,00
68,00	0,00	68,00	0,00	68,00	0,00
89,00	0,00	89,00	0,00	89,00	0,00
110,00	0,00	110,00	0,00	110,00	0,00
131,00	0,00	131,00	0,00	131,00	0,00

Sistema 6

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16,00	0,00	16,00	0,00	16,00	0,00
34,00	0,00	34,00	0,00	34,00	0,00
49,00	0,00	49,00	0,00	49,00	0,00
68,00	0,00	68,00	0,00	68,00	0,00
89,00	0,00	89,00	0,00	89,00	0,00
110,00	0,00	110,00	0,00	110,00	0,00
131,00	0,00	131,00	0,00	131,00	0,00

Sistema 7

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18,04	0,00	18,04	0,00	35,04	0,05
35,04	0,00	35,04	0,00	50,00	0,07
50,00	0,00	50,00	0,00	67,00	0,08
67,00	0,00	67,00	0,00	88,05	0,14
88,05	0,00	88,05	0,00	109,00	0,21
109,00	0,00	109,00	0,00	130,00	0,24
130,00	0,00	130,00	0,00		

Sistema 8

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17,00	0,00	17,00	0,00	17,00	0,00
34,00	0,00	34,00	0,00	34,00	0,00
49,00	0,00	49,00	0,00	49,00	0,00
66,00	0,00	66,00	0,00	66,00	0,00
87,00	0,00	87,00	0,00	87,00	0,00
108,00	0,00	108,00	0,00	108,00	0,00
129,00	0,00	129,00	0,00	129,00	0,00
150,00	0,00	150,00	0,00	150,00	0,00

Sistema 9

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15,00	0,10	11,00	0,08	12,11	0,22
49,92	0,39	59,00	0,69	49,92	0,89
62,00	0,48	69,00	0,84	62,00	1,12
70,97	0,57	96,00	1,19	69,00	1,22
80,85	0,66	111,00	1,26		

Sistema 10

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	0,04	5,00	0,15	3,00	0,11
10,00	0,07	9,00	0,23	7,00	0,32
15,00	0,14	12,00	0,31	10,00	0,41
21,00	0,19	18,00	0,45	14,00	0,57
25,00	0,24	24,00	0,59	24,00	0,92
30,00	0,29				
35,00	0,31				

Sistema 11

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19,00	0,06	30,00	0,30	12,00	0,21
79,00	0,34	39,00	0,45	15,01	0,48
161,00	0,66	60,00	0,65	28,00	0,55
196,00	0,77	91,00	1,05	51,00	1,15
		121,00	1,26	63,00	1,40
				80,04	1,70

Temp. 70 °C		Temp. 80 °C		Temp. 90 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10,00	0,73	2,00	0,30	2,00	0,74
13,00	1,01	4,00	0,84	3,00	0,92
17,00	1,30	7,04	1,43	4,00	1,30
24,00	2,00	10,00	2,00	5,00	1,70
				6,00	2,00

Temp. 57 °C
(almacenado en polietileno)

tiempo	absorbancia
0,00	0,00
5,96	0,20
10,94	0,50
17,93	0,73
25,80	0,94
32,00	1,05

Sistema 12

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19,07	0,03	11,02	0,05	11,00	0,16
29,11	0,04	19,07	0,07	19,00	0,35
53,13	0,08	29,11	0,12	28,00	0,53
60,00	0,09	39,00	0,19	36,00	0,77
		43,00	0,21	43,00	1,02
		53,13	0,27	45,00	0,98
		60,00	0,32	78,00	1,82
		91,00	0,51		

Sistema 13

Temp. 57 °C

tiempo	absorbancia
0,00	0,00
10,94	0,09
20,97	0,18
32,00	0,26
52,88	0,41
62,81	0,45
73,78	0,55

Sistema 14

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
35,00	0,02	20,42	0,05	21,06	0,15
72,00	0,05	35,00	0,11	41,92	0,34
85,92	0,06	41,42	0,12	62,92	0,45
106,00	0,08	64,92	0,18	84,00	0,71
141,00	0,11	106,00	0,38	127,00	1,05
165,00	0,14	127,08	0,44		
		165,00	0,56		

Sistema 15		Sistema 16		Sistema 17	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22,00	0,19	21,06	0,19	21,06	0,21
44,13	0,41	41,20	0,40	41,92	0,41
90,83	0,86	62,92	0,56	62,92	0,62
107,00	1,01	84,00	0,74	84,00	0,76
		127,00	1,14	105,00	1,00

Sistema 18	
Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia
0,00	0,00
22,97	0,43
43,17	0,55
63,88	0,90
83,14	1,19
125,19	1,60

Sistema 19					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17,00	0,00	17,00	0,00	17,00	0,00
34,00	0,00	34,00	0,00	34,00	0,00
49,00	0,00	49,00	0,00	49,00	0,00
66,00	0,00	66,00	0,00	66,00	0,00
87,00	0,00	87,00	0,00	87,00	0,00
108,00	0,00	108,00	0,00	108,00	0,00
129,00	0,00	129,00	0,00	129,00	0,00
				150,00	0,00

Sistema 20

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00
64,00	0,00	42,00	0,00	42,00	0,00
84,00	0,00	64,00	0,00	64,00	0,00
105,00	0,00	84,00	0,00	84,00	0,00
149,00	0,00	105,00	0,00	128,00	0,00
175,00	0,00	128,00	0,00	149,00	0,00
		149,00	0,00	173,00	0,00

Sistema 21

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20,42	0,00	20,42	0,00	20,42	0,02
41,42	0,00	41,42	0,00	41,42	0,03
64,92	0,00	64,92	0,00	64,92	0,07
106,00	0,00	106,00	0,00	106,00	0,12
127,08	0,00	127,08	0,00	127,08	0,43
148,16	0,00	148,16	0,00	148,16	0,63
				160,51	0,91
				172,85	1,15

Sistema 22

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
44,94	0,00	44,94	0,00	44,94	0,17
62,94	0,00	62,94	0,00	62,94	0,21
104,00	0,00	104,00	0,00	104,00	0,36
124,92	0,00	124,92	0,00	124,92	0,51
				145,86	0,55
				170,59	0,62

Sistema 24		Sistema 25		Sistema 26	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15,01	0,64	23,02	1,00	6,07	0,07
27,04	0,96	30,06	1,17	16,09	0,15
37,97	1,40	37,05	1,37	23,02	0,19
48,81	1,70	49,14	1,70	30,06	0,22
57,73	1,82			37,05	0,30
				49,14	0,43

Sistema 27		Sistema 28		Sistema 29	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7,00	0,05	14,00	0,49	14,88	0,45
14,00	0,11	27,85	0,93	26,81	0,78
27,85	0,20	47,88	1,62	35,73	1,10
36,77	0,44	59,08	1,82	46,83	1,30
47,88	0,89			58,83	1,76
70,08	1,70			69,04	1,82
79,07	1,82				

Sistema 30

Temp. 57 °C

tiempo	absorbancia
0,00	0,00
14,88	0,41
26,81	0,80
35,73	0,87
46,83	1,30
69,04	1,82

Sistema 41

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33,92	0,00	33,92	0,00	33,92	0,00
63,03	0,00	63,03	0,00	63,03	0,00
91,81	0,00	91,81	0,00	91,81	0,00
151,90	0,00	151,90	0,00	151,90	0,00
167,65	0,00	167,65	0,00	167,65	0,00
197,00	0,00	197,00	0,00	197,00	0,00

Sistema 42

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
42,00	0,00	42,00	0,00	42,00	0,00
61,05	0,00	61,05	0,00	61,05	0,00
85,00	0,00	85,00	0,00	85,00	0,00
93,76	0,00	93,76	0,00	93,76	0,00
168,00	0,00	168,00	0,00	168,00	0,00
210,00	0,00	210,00	0,00	210,00	0,00

Sistema 43

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,00	0,00	6,00	0,01	5,99	0,01
29,86	0,00	29,86	0,02	22,96	0,05
50,98	0,00	50,98	0,04	46,83	0,12
74,78	0,00	74,78	0,05	67,88	0,17
95,74	0,00	95,74	0,07	89,84	0,23
136,75	0,00	136,75	0,09		

Sistema 44

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
48,99	0,00	48,99	0,02	29,88	0,05
74,78	0,00	74,78	0,04	57,96	0,12
104,89	0,00	104,89	0,08	111,86	0,33
136,75	0,00	136,75	0,10	141,78	0,47
172,98	0,00	172,98	0,12		
202,78	0,00	202,78	0,12		

Sistema 45		Sistema 46		Sistema 47	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,13
41,02	0,00	41,02	0,00	41,02	0,27
61,96	0,00	61,96	0,00	61,96	0,43
83,05	0,00	83,05	0,00	83,05	0,55
105,04	0,00	105,04	0,00	105,04	0,64
125,02	0,00	125,02	0,00	125,02	0,92

Sistema 48		Sistema 49		Sistema 50	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia	tiempo	absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20,96	0,21	20,96	0,02	42,04	0,54
41,90	0,41	41,90	0,03	63,11	0,87
63,00	0,63	63,00	0,05	105,83	1,46
84,97	0,89	84,97	0,05	126,18	1,70
104,96	0,92	104,96	0,08		
125,84	1,26	125,84	0,10		

Sistema 51		Sistema 52		Sistema 53	
Temp. 57 °C		Temp. 57 °C		Temp. 57 °C	
Tiempo	Absorbancia	Tiempo	Absorbancia	Tiempo	Absorbancia
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7,00	0,03	21,04	0,22	21,04	0,34
21,11	0,09	41,00	0,45	41,00	0,64
42,04	0,19	63,04	0,64	63,04	0,92
63,11	0,82	83,97	0,99	83,97	1,40
84,08	1,26	104,97	1,12	104,97	1,70
105,08	1,70	126,01	1,46	126,01	1,82

3 - Degradación de sorbato de potasio en homogenatos cárnicos

A continuación se detallan los datos obtenidos en el estudio de la degradación del sorbato de potasio en homogenatos cárnicos. El tiempo se expresó en días. Para todos los casos, salvo que se indique lo contrario, se utilizó carne cruda para la preparación de los sistemas y se almacenó con cámara de aire.

Sistema 1					
Temp. 70 °C		Temp. 80 °C		Temp. 90 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
0,25	90,1	0,25	86,6	0,25	83,1
0,42	84,6	0,42	78,9	0,55	66,4
0,50	81,4	0,50	76,0	0,58	63,2
0,58	77,2	1,04	67,0	1,04	60,7
2,13	71,4	2,13	60,1	2,13	54,1
3,13	67,3	4,13	53,1	3,13	52,1
4,13	67,9	6,04	48,2	4,13	47,5
6,04	61,5	7,17	45,6	6,21	43,6
				7,17	39,5

Sistema 2					
Temp. 70 °C		Temp. 80 °C		Temp. 90 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
0,33	96,0	0,25	87,3	0,08	94,0
0,42	94,7	0,33	84,1	0,42	76,7
0,50	93,0	0,42	80,1	0,50	72,8
0,96	87,4	0,50	77,0	1,04	85,5
1,04	85,5	1,04	72,1	2,13	78,7
2,13	78,7	1,58	69,2	2,67	71,3
2,67	71,3	2,67	63,2	3,17	71,1
3,17	71,1	4,13	60,4	3,63	68,6
3,63	68,6	5,04	57,9	4,13	67,3
4,13	67,3	5,75	54,0	5,04	65,0
5,04	65,0			6,71	58,0
6,71	58,0				

Sistema 3

Temp. 70 °C		Temp. 80 °C		Temp. 90 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
0,38	93,4	0,38	91,4	0,38	91,4
0,77	87,2	0,77	82,8	0,77	82,8
1,04	82,4	1,04	78,0	1,04	78,0
3,35	75,9	3,35	58,0	2,13	58,8
5,10	66,7	5,10	52,9	5,10	49,0
6,09	63,9	6,09	50,0	6,09	47,1
8,04	59,3	7,08	46,8		

Sistema 4

Temp. 90 °C

tiempo	% retención
0,00	100,0
0,40	79,4
0,79	65,3
1,08	56,8
2,00	52,3
3,00	51,0
3,88	48,4
5,98	43,4

Sistema 5

Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
21,00	86,4	14,08	75,0	14,08	64,7
42,00	70,3	28,00	67,9	28,00	47,5
55,08	63,5	42,00	51,8	35,96	39,3
84,04	50,4	57,00	40,1	42,00	37,9
106,13	45,1	71,13	34,7	49,88	33,9
				57,00	26,7
				64,08	22,8

Continuación sistema 5

Temp. 33 °C
(atmósfera de nitrógeno)

tiempo	% retención
0,00	100,0
30,98	82,6
48,84	73,8
70,77	63,4
105,76	51,2

Temp. 70 °C		Temp. 80 °C		Temp. 90 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
0,58	90,5	1,00	82,0	0,58	81,7
1,00	84,1	1,96	70,0	1,00	70,0
1,96	74,6	2,83	60,0	1,96	52,0
2,83	65,4	3,65	51,0	2,83	44,0
3,65	60,7	4,65	49,0	3,65	42,8
4,65	56,7	6,69	43,0	4,65	42,2
6,69	51,2	9,64	33,8	5,91	38,0
9,64	44,3			7,77	34,0

(preparado con carne cocida)

Temp. 70 °C		Temp. 80 °C		Temp. 90 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
0,58	89,9	0,58	89,0	0,25	91,4
1,00	85,6	1,00	81,6	0,58	80,6
2,83	63,7	2,83	59,2	1,00	71,3
3,65	64,6	3,65	57,0	1,96	59,2
4,65	60,3	4,65	54,3	2,83	55,6
6,69	54,8	6,69	48,1	3,65	53,4
9,64	49,4			4,65	50,1
				5,91	48,3
				7,77	42,8

Sistema 6					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
23,01	72,9	14,00	79,0	6,99	77,4
42,03	64,5	27,97	63,7	14,00	61,7
53,98	55,7	42,03	51,5	21,00	49,9
63,00	55,7	55,92	42,0	27,97	40,2
104,77	38,0			34,92	31,4

Sistema 7					
Temp. 33 °C		Temp. 45 °C		Temp. 57 °C	
tiempo	% retención	tiempo	% retención	tiempo	% retención
0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	100,0
23,01	82,4	14,00	83,3	6,99	75,4
42,03	76,6	27,97	66,4	14,00	61,8
53,98	73,5	42,03	54,3	21,00	52,1
63,00	71,6	55,92	46,1	27,97	44,4
84,83	59,5			34,92	38,1
104,77	56,0				

PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA

Para poder predecir la actividad de agua de un alimento se debe conocer la composición del mismo. En el caso de los alimentos procesados con una baja proporción de agua (a_w menor a 0,75), la depresión de la actividad de agua es debida fundamentalmente a fenómenos de sorción. En cambio, en los alimentos en los cuales el agua es un constituyente importante del sistema (a_w mayor a 0,75), la depresión de la actividad de agua se debe principalmente a fenómenos de disolución de solutos. Este es el caso de los sistemas estudiados en este trabajo, razón por la cual, se explicará la metodología a seguir para la predicción de la actividad de agua en alimentos con alto contenido de agua.

La actividad de agua es la relación entre la presión de vapor de agua en el alimento (p_i) y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.

$$a_w = p_i / p^{agua\ pura} \quad (1)$$

La presión de vapor de agua para una solución ideal en equilibrio esta dada por la ley de Raoult:

$$p_i = p_i^\circ \cdot x_i \quad (2)$$

Esto indica que la presión parcial de cualquier componente de una solución (p_i) es igual a la presión parcial del componente puro (p_i°) por su fracción molar en la solución. Por lo tanto:

$$a_w = x_w = n_w / n_w + n_s \quad (3)$$

donde: n_w es el número de moles de agua
 n_s es el número de moles de soluto

La ley de Raoult es válida para soluciones ideales; no obstante para soluciones diluidas su aplicación permite obtener valores precisos de la actividad de agua (Ross, 1975). Conforme se incrementa la concentración de solutos se producen desviaciones de la ley de Raoult. En general, los compuestos iónicos muestran mayores desviaciones de la idealidad que los no iónicos. Por esta razón para

estimar la actividad de agua para soluciones no ideales se utiliza el coeficiente osmótico molal (ϕ) que se define como:

$$\phi = -55,51 \ln a_w / m_1 v_1 \quad (4)$$

donde: 55,51 es el número de moles de agua en un kilogramo de agua
 m_1 es la concentración molal de soluto
 v_1 es el número de partículas en que se disocia el soluto

Los valores del coeficiente osmótico para distintos electrolitos y no electrolitos han sido reportados por Robinson y Stokes (1968) y por Scatchard y col. (1938).

A partir de la ecuación 4 se puede estimar la actividad de agua:

$$\ln a_w = -v_1 m_1 \phi / 55,51 \quad (5)$$

Pitzer (1973) desarrolló un sistema de ecuaciones usadas para el cálculo de propiedades termodinámicas de electrolitos sobre la base de un análisis mejorado del modelo de Debye-Huckel. Este modelo es especialmente útil para soluciones de NaCl, siendo exacto para la predicción de la actividad de agua de soluciones hasta una concentración 6 molal. El coeficiente osmótico esta dado por la siguiente expresión:

$$1 - \phi = |Z_M Z_X| f + m^2 v_M v_X / v \beta_{MX} + m^2 2 (v_M v_X / v)^{1/2} C_{MX} \quad (6)$$

donde: v_M y v_X son el número de iones de M y X en la fórmula;
 Z_M y Z_X son sus respectivas cargas; $v = v_M + v_X$.

Las otras cantidades se definen como:

$$f = -A (I^2 / 1 + b I^{1/2})$$

donde: A es el coeficiente de Debye-Huckel y tiene un valor de 0,392 a 25 °C ; b = 1,2 para todos los solutos (Pitzer, 1973); I es la fuerza iónica calculada como:

$$I = 1/2 \sum m_i Z_i^2$$

$$\beta_{MX} = \beta_{MX}^{(0)} + \beta_{MX}^{(1)} \exp (- \alpha I^{1/2})$$

$\beta_{MX}^{(0)}$ y $\beta_{MX}^{(1)}$ definen el primero y segundo coeficiente virial y C_{MX} define el tercer coeficiente virial, $\alpha = 2$ (Pitzer y Mayorga, 1973).

Combinando las ecuaciones 5 y 6 se llega a una ecuación general para estimar la actividad de agua de soluciones de electrolitos:

$$\ln a_w = m_1 v_1 / 55,51 \left[|Z_M Z_X| f + m^2 v_M v_X / v \beta_{MX} + m^2 v_M v_X / v \right]^{3/2} C_{MX} - 1 \quad (7)$$

Para predecir la actividad de agua de soluciones acuosas de no electrolitos se emplea el modelo de Norrish (1966):

$$a_w = x_1 \exp (-K x_2^2) \quad (8)$$

donde: x_1 y x_2 son las fracciones molares de agua y soluto respectivamente y K es una constante.

Para los sistemas multicomponentes, Ross (1975) desarrolló una ecuación sencilla para estimar la actividad de agua. La misma se basa en realizar varias simplificaciones en la ecuación de Gibbs-Duhem:

$$\sum n_i d \ln (a_i) = 0 \quad \text{a P y T constantes} \quad (9)$$

donde: n_i es el número de moles del componente i y a_i es su actividad. Suponiendo que no hay interacción entre los distintos solutos, se llega a la siguiente expresión (Ross, 1975).

$$a_w = (a_{w1}^o) (a_{w2}^o) (a_{w3}^o) \dots \dots (a_{wn}^o) \quad (10)$$

Esta ecuación indica que la a_w de la mezcla es la productoria de la a_w de cada componente (a_{wi}^o) a la molalidad total del sistema, independientemente de los otros solutos presentes. Es decir, supone que en la solución no hay interacción entre los distintos solutos. Por lo tanto, la actividad de agua de la mezcla, a_w , es el producto de las actividades de agua de cada componente, calculada considerando que cada uno de ellos está disuelto en toda el agua del sistema.

La validez de esta ecuación para predecir la actividad de agua de mezclas fue estudiada por Chirife y col. (1980). Estos autores encontraron que es posible calcular con razonable exactitud la actividad de agua de mezclas multicomponentes de solutos de interés en la preservación de alimentos, como lo son las sales inorgánicas, azúcares y polioles. De todas formas, cuando se trabaja con sistemas complejos, es conveniente realizar mediciones experimentales para corroborar la validez de la actividad de agua estimada mediante la aplicación de un modelo (Corry, 1987).

PROCEDIMIENTOS ESTADISTICOS**1 - PUESTA A PUNTO DE LOS METODOS DE DOSAJE DE ACIDO SORBICO,
p. 313**

- 1.1 - Errores y su origen, p. 313
- 1.2 - Distribución normal, p. 314
- 1.3 - Exactitud y precisión, p. 315
- 1.4 - Estimadores estadísticos, p. 316
- 1.5 - Test de hipótesis, p. 319
- 1.5.1 - Significación estadística, p. 320
- 1.5.2 - Prueba t, p. 320
- 1.5.3 - Prueba a una cola versus prueba a dos colas, p. 323

2 - ESTABILIDAD DEL ACIDO SORBICO, p. 323

- 2.1 - Regresión lineal, p. 324
- 2.1.1 - Cálculo de los parámetros de la recta de regresión, p. 326
- 2.1.2 - Bondad del ajuste, p. 326
- 2.1.2.1 - Análisis de la varianza sobre la regresión, p. 326
- 2.1.2.2 - Coeficiente de determinación, p. 328
- 2.1.3 - Error estándar e intervalo de confianza de los parámetros de la recta de regresión, p. 330
- 2.1.4 - Análisis de covarianza, p. 331
- 2.2 - Correlación, p. 334

PROCEDIMIENTOS ESTADISTICOS

En este apéndice se presentarán las diferentes pruebas estadísticas que han sido utilizados para el análisis de las experiencias realizadas en esta tesis.

1 - PUESTA A PUNTO DE LOS METODOS DE DOSAJE DE ACIDO SORBICO

Para abordar el análisis estadístico realizado para la selección de técnicas adecuadas que permitan el dosaje del ácido sórbico, conviene revisar algunos conceptos y definiciones.

1.1 - Errores y su origen (Spiridinov y Lopatkin, 1973)

Toda medición experimental está asociada a la aparición de errores, los cuales, a grandes rasgos, se pueden clasificar según su origen en: i) errores indeterminados, también llamados casuales, aleatorios o estadísticos, ya que varían en forma aleatoria de una medición a otra y la magnitud de dicha variación no sigue un patrón definido; ii) errores determinados, los cuales, en general, afectan a cada medición de igual forma.

Entre los errores determinados o sistemáticos se pueden distinguir:

- 1) errores instrumentales originados por defectos o irregularidades de los instrumentos de medición.
- 2) errores vinculados con el estado del medio ambiente en el que se realizan los experimentos.
- 3) errores debidos a las particularidades del experimentador (errores subjetivos o personales).
- 4) errores debidos a la inexactitud de las constantes de graduación de los instrumentos y a la precisión limitada de las constantes universales.
- 5) errores aportados por el mismo método de medición debido al carácter aproximado de las correlaciones teóricas que vinculan las magnitudes observadas en el experimento con las magnitudes que interesan directamente al experimentador.

En base a lo mencionado, se desprende que es necesario realizar un estudio minucioso del método de medición y del instrumental

empleado para identificar los errores sistemáticos involucrados a fin de tratar de eliminarlos o bien, de conocer su incidencia.

En cuanto a los errores indeterminados o accidentales, estos están asociados con factores que sufren pequeñas variaciones durante el ensayo y puesto que el resultado de cada medición individual depende de la acción de un gran número de factores que varían durante el ensayo, se considera a los errores accidentales dependientes del azar. Debido a esto, se los trata como una magnitud aleatoria, es decir, regulada por las leyes de la probabilidad. Este tratamiento permite su estimación cuantitativa.

La clasificación de los errores mencionada, es una convención, ya que en la práctica los errores asociados a una técnica experimental tienen diferentes orígenes y pueden ser en parte aleatorios y en parte determinados. Mediante la aplicación de técnicas estadísticas es posible identificar el origen de los errores cometidos y minimizarlos.

1.2 - Distribución normal (Blaedel y Meloche, 1963)

La frecuencia de ocurrencia de una serie de mediciones se puede representar mediante una curva de distribución normal la cual se muestra en la Figura 1. La ecuación que describe esta curva es:

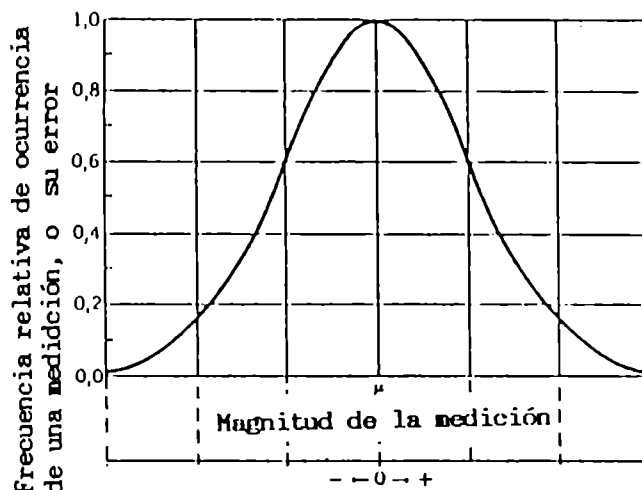
$$Y = e^{-1/2 [(X-\mu) / \sigma]^2} \quad (1)$$

donde: X es la abcisa, e indica la magnitud medida;
Y es la ordenada, e indica la frecuencia relativa de ocurrencia de una dada medición. Arbitrariamente, se toma $Y = 1$ para el valor más probable que es $X = \mu$;
 μ es un parámetro de la curva y representa el valor verdadero de la cantidad medida. μ es el valor de X al cual la curva presenta un máximo;
 σ es la verdadera desviación estándar. Es el parámetro de la curva que determina la agudeza del pico.

En la Figura 1 se aprecia que:

- a) La curva es simétrica, lo que indica que los errores positivos o negativos tienen igual probabilidad de ocurrencia. Además, cada error positivo tiende a estar asociado a un error negativo de similar magnitud.
- b) Los errores de escasa magnitud ocurren con mayor frecuencia que los errores de gran magnitud.
- c) La ocurrencia de grandes errores es relativamente improbable.

Figura 1: Curva de distribución normal.



La forma de la curva es un indicativo de la precisión de un serie de mediciones. Un método preciso da como resultado una curva estrecha y aguda que cae abruptamente cuando los errores son grandes.

1.3 - Exactitud y precisión (Blaedel y Meloche, 1963)

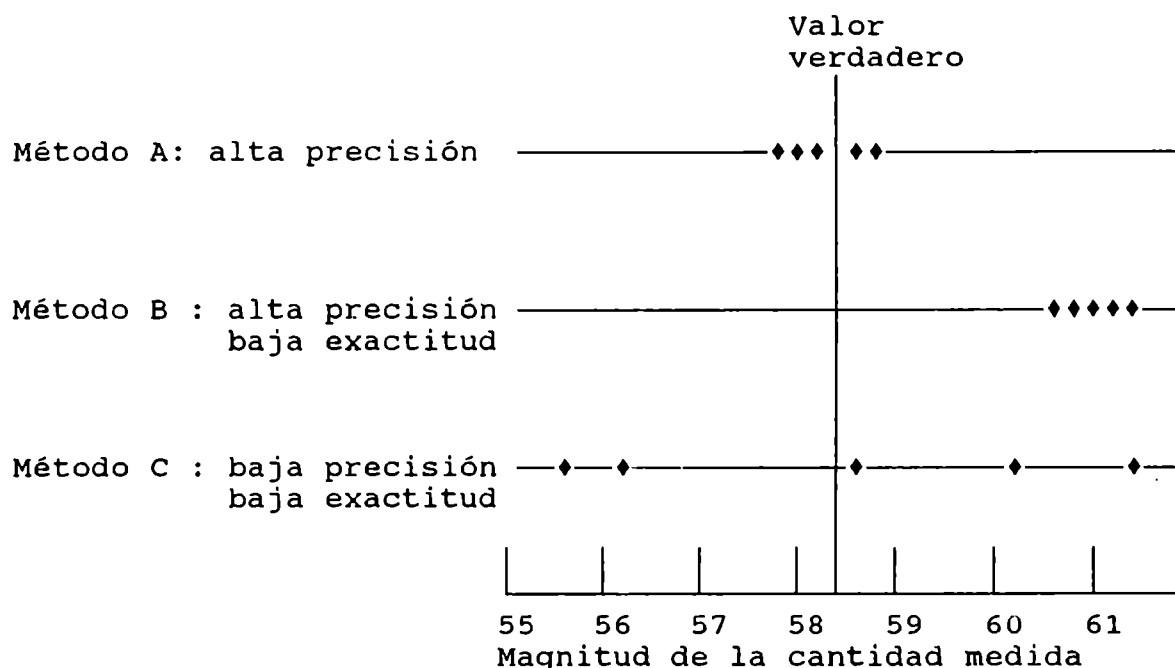
Definiciones

La exactitud de una medición indica la diferencia entre el valor observado y el valor verdadero. Se dice que una medición tiene una exactitud alta o baja, en función de cuan próximo o alejado está el valor medido del valor verdadero.

La precisión de una serie de mediciones de una dada cantidad describe la diferencia entre las mediciones individuales; si las mismas están próximas unas de otras, se dice que la técnica empleada posee alta precisión. En cambio, si las mediciones son dispares unas de otras, se dice que la técnica presenta baja precisión.

El siguiente ejemplo ilustra los conceptos antes mencionados. Si se dosa una determinada cantidad de sorbato de potasio conocida por quintuplicado, mediante tres métodos diferentes A, B y C, para cada serie de mediciones, los resultados obtenidos presentarán una dada dispersión (debido al error inherente a toda determinación experimental). Ello se muestra en la Figura 2. Como puede apreciarse, el método A presenta una alta precisión pues los valores de las determinaciones individuales son cercanos unos de otros; además, la exactitud es alta ya que cada una de las determinaciones individuales es próxima al valor verdadero (cantidad de sorbato de potasio adicionada). El método B tiene alta precisión, pero su exactitud es baja debido a que el valor de las mediciones individuales está alejado del valor verdadero.

Figura 2 : Exactitud y precisión en métodos analíticos.



El método C presenta baja precisión ya que hay una gran dispersión entre las distintas determinaciones y baja exactitud pues las determinaciones se apartan en gran medida del valor verdadero (con excepción de una única medición cuyo valor está próxima al valor verdadero, probablemente por azar).

La exactitud y la precisión, en cuanto a su significación estadística están asociadas a los términos error y desviación y existen diferentes estimadores estadísticos que permiten su cuantificación, los que se definen a continuación.

1.4 - Estimadores estadísticos (Blaedel y Meloche, 1963)

La exactitud de una medición se puede expresar cuantitativamente mediante el error. El mismo es bajo, cuando la exactitud es alta.

Error absoluto de una medición (E_{ab}): representa la diferencia entre el valor medido (X_i) y el valor verdadero (μ)

$$E_{ab} = X_i - \mu \quad (2)$$

También es útil indicar el error de la media de una serie de mediciones, el cual será:

$$E_{ab} = X_m - \mu \quad (3)$$

Siendo $X_m = \Sigma X_i / n$

X_i valor individual
 n número total de datos
 μ valor verdadero

Error relativo (E.R): representa el cociente entre el error absoluto y el valor verdadero.

$$E.R = E_{ab} / \mu \quad (4)$$

Es un parámetro de mayor utilidad ya que expresa al error en relación a la magnitud medida.

Es de destacar que el error de una medición o de una serie de mediciones no puede ser estimado si se desconoce el valor verdadero.

Para la cuantificación de la precisión de una serie de mediciones se pueden utilizar diferentes estimadores estadísticos:

Desviación de una medición (x_i): representa la diferencia entre el valor de una dada medición con respecto a la media.

$$x_i = X_i - X_m \quad (5)$$

Desviación media (x_m) de una serie de mediciones: representa el promedio de la sumatoria en valor absoluto de las desviaciones de cada una de las mediciones realizadas.

$$x_m = \Sigma x_i / n \quad (6)$$

Rango de la desviación (w): representa la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de una serie de determinaciones. Se utiliza, generalmente, cuando se dispone de un pequeño número de datos.

$$w = X_{\text{máximo}} - X_{\text{mínimo}} \quad (7)$$

Varianza (S^2): representa el promedio de las diferencias al cuadrado entre los valores individuales y la media. Su fórmula de cálculo es:

$$S^2 = \Sigma (X_i - X_m)^2 / n-1 \quad (8)$$

Desviación estándar (S): representa la raíz cuadrada de la sumatoria de las desviaciones de cada medición dividida la raíz cuadrada de el numero de datos menos uno, es decir, representa la raíz cuadrada de la varianza.

$$S = \sqrt{\Sigma x_i} / \sqrt{(n-1)} \quad (9)$$

Coefficiente de variación (c.v): representa el cociente entre la desviación estándar y la media.

$$c.v = S / X_m \quad (10)$$

Este estimador fue el elegido para evaluar la precisión de las técnicas analíticas ensayadas.

Error estándar de la media (SE): representa el cociente entre la desviación estándar y el número de datos y puede ser considerado como la desviación estándar estimada de la distribución de medias que se esperaría si el experimento se repitiera un infinito número de veces.

$$SE = S / \sqrt{n} \quad (11)$$

Error estándar de la diferencia ($SE_{a,b}$): es una medida del grado en que la diferencia de dos medias variará por el azar. Se estima a partir de los errores estándar de las dos distribuciones mediante la siguiente fórmula, que solamente puede aplicarse a distribuciones independientes:

$$SE_{a,b} = (SE_a^2 + SE_b^2)^{1/2} \quad (12)$$

Intervalo de confianza: indica cuál es el límite inferior y superior del estimador, a los que se denomina límites de confianza. Al porcentaje de probabilidad de que el valor verdadero μ este comprendido en el intervalo de confianza, se lo denomina nivel de confianza. La probabilidad de error (100 - nivel de confianza) indica el porcentaje de probabilidad de que el estimador caiga afuera del intervalo de confianza.

Para un nivel de significación establecido, un estimador será más preciso cuanto más estrecho sea su intervalo.

Para un intervalo fijo, un estimador será más preciso cuanto más pequeña sea la probabilidad de error.

En el caso de la media, su cálculo se realiza según la siguiente ecuación:

$$\mu = X_{med} \pm t_{\alpha/2, (n-1)} S / \sqrt{n} \quad (13)$$

La cantidad $t_{\alpha/2, (n-1)}$ corresponde al estadístico t, el cual será explicado luego en detalle. Su valor se obtiene de tablas, a partir del valor del nivel de significación $\alpha/2$ y de $(n-1)$ grados de libertad del sistema.

Los grados de libertad (g.l) están asociados con la independencia funcional de las mediciones realizadas. Por ejemplo, en la expresión $A + B = 0$, A y B son funciones dependientes, ya que al fijar el valor de uno de ellos se está fijando el valor del otro. Así cuando n mediciones se expresan como desviaciones de la media muestral, todas ellas menos una pueden variar libremente si colocamos la restricción de que la suma de las desviaciones debe ser igual a cero. En general, el número de grados de libertad es igual al número de mediciones menos el número de restricciones algebraicamente independientes que están presentes en el sistema.

1.5 - Test de hipótesis (Meilgaard, 1987)

A fin de establecer si la media de un serie de mediciones es igual al valor verdadero o bien si las medias de dos series de mediciones realizadas con diferentes técnicas son iguales, se aplica un test de hipótesis.

Un test de hipótesis involucra los siguientes pasos:

- 1) Se establece el objetivo de la investigación en términos matemáticos bajo la denominación de hipótesis nula (H_0), por ejemplo $H_0: \mu = c$, siendo c una constante.
- 2) El analista, basado en el interés prioritario de la investigación, formula otro requerimiento matemático bajo el nombre de hipótesis alternativa (H_1), por ejemplo $H_1: \mu > c$ ó $\mu < c$.
- 3) Se toma una muestra de elementos de la población y se efectúa sobre cada elemento la medición de interés.
- 4) Se calcula el valor del estadístico utilizado para estimar el parámetro de interés.
- 5) Basado en el conocimiento de la distribución de probabilidad de las mediciones y asumiendo el valor del parámetro de interés, bajo la certeza de la hipótesis nula, el analista calcula la probabilidad de que el estadístico elegido tome el valor calculado en el punto 4. Si dicha probabilidad es pequeña a un nivel de confianza elegido (α), la hipótesis nula se refuta en favor de la hipótesis alternativa.

1.5.1 - Significación estadística

Una explicación breve de la significación estadística es que muestra la probabilidad, generalmente expresada como porcentaje, de que un determinado resultado pueda haber ocurrido por azar. Está muy relacionada con la hipótesis nula. Por ejemplo, el asegurar significación al nivel del 1% implica que solamente hay una chance en 100 de que la hipótesis nula sea aceptada por azar. En algunos casos, la significación se expresa como nivel de confianza, que es el complemento. Por ejemplo, un nivel de confianza del 95 % es equivalente a un nivel de significación del 5 %.

Cuando se formula una conclusión se corre el riesgo de rehusar un valor "bueno" por considerarlo "malo", este riesgo se denomina error α o error de tipo I. También se corre el riesgo de aceptar un resultado "malo" como "bueno", en este caso se comete un error β o error de tipo II. El siguiente cuadro sintetiza estos conceptos:

	Conclusión establecida	
	H_0 refutada	H_0 aceptada
H_0 verdadera	error Tipo I	decisión correcta
H_0 falsa	decisión correcta	error Tipo II

Generalmente, en una determinada experiencia, para disminuir el error Tipo I, se debe trabajar con niveles de significación muy bajos, pero de esta forma se aumenta la probabilidad de cometer un error Tipo II.

1.5.2 - Prueba t

Para determinar la significación de la diferencia entre la media y el valor verdadero, o bien la diferencia entre medias de dos grupos independientes de datos se puede utilizar la prueba t.

Para que la aplicación de la prueba sea correcta, se debe suponer que la población se distribuye normalmente, si bien, ligeras anormalidades no influyen decisivamente sobre la bondad de las conclusiones obtenidas.

El estadístico t para el caso de comparar la diferencia en entre la media y el valor verdadero es:

$$t = X_m - \mu / SE \quad (14)$$

donde: X_m = media de la serie de mediciones
 μ = valor verdadero de la serie de mediciones
 SE = estimador del error estándar de la serie de mediciones.

Dado que el denominador del cociente t se ha definido como el error estándar de la serie de mediciones, se ha impuesto una restricción algebraica. Por lo tanto, el número de grados de libertad será $(n - 1)$, siendo n = número de mediciones.

El estadístico t para el caso de comparar las medias de dos series de mediciones independientes es:

$$t = X_a - X_b / SE_{a,b} \quad (15)$$

donde: X_a = media del grupo a
 X_b = media del grupo b

En este caso, dado que el denominador del cociente t se ha definido como el error estándar de la diferencia de medias, se ha impuesto una restricción algebraica sobre cada grupo de datos, en consecuencia, el número total de grados de libertad será:

$$g.l = n_a + n_b - 2 \quad (16)$$

donde: n_a = número de mediciones en el grupo a
 n_b = número de mediciones en el grupo b

Es de destacar que, para la correcta aplicación de la prueba, las dos poblaciones deben tener una distribución normal y la varianza debe ser la misma para ambas. No obstante, pequeñas desviaciones con respecto a estas hipótesis no afectan sensiblemente, la bondad de la prueba.

El valor obtenido del cálculo del estadístico t puede compararse con el extraído de la Tabla 1, para los grados de libertad que correspondan y el nivel de significación (α) elegido. Si el valor calculado es menor que el tabulado se acepta la hipótesis nula (la diferencia no es significativa al nivel de probabilidad elegido). Por el contrario si el valor calculado es mayor al tabulado, se rechaza la hipótesis nula, en favor de la hipótesis alternativa.

Los niveles de probabilidad tabulados son los de $P \geq 0,95$ ($\alpha \leq 0,05$); $P \geq 0,99$ ($\alpha \leq 0,01$) y $P \geq 0,999$ ($\alpha \leq 0,001$). El nivel elegido en este trabajo fue $P \geq 0,999$.

Tabla 1: Valores del estadístico t_{α}

f	p						
	0,50	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005
1	1,00000	2,1142	6,3138	12,706	25,452	63,657	127,32
2	0,81650	1,6036	2,9200	4,3027	6,2053	9,9218	14,059
3	0,76489	1,4226	2,3534	3,1825	4,1765	5,8109	7,4533
4	0,74070	1,3441	2,1318	2,7764	3,4954	4,6011	5,5976
5	0,72669	1,3009	2,0150	2,5706	3,1634	4,0321	4,7733
6	0,71756	1,2733	1,9432	2,4469	2,9687	3,7074	4,3168
7	0,71114	1,2543	1,8916	2,3616	2,8412	3,4995	4,0293
8	0,70639	1,2403	1,8595	2,3060	2,7515	3,3554	3,8325
9	0,70272	1,2297	1,8331	2,2622	2,6850	3,2498	3,6897
10	0,69981	1,2213	1,8125	2,2281	2,6338	3,1693	3,5814
11	0,69745	1,2145	1,7959	2,2010	2,5931	3,1058	3,4966
12	0,69548	1,2089	1,7823	2,1789	2,5600	3,0545	3,4284
13	0,69384	1,2041	1,7709	2,1601	2,5326	3,0123	3,3725
14	0,69242	1,2001	1,7613	2,1448	2,5096	2,9768	3,3257
15	0,69120	1,1967	1,7530	2,1315	2,4899	2,9467	3,2860
16	0,69013	1,1937	1,7459	2,1199	2,4729	2,9208	3,2520
17	0,68919	1,1910	1,7396	2,1098	2,4581	2,8982	3,2225
18	0,68837	1,1887	1,7341	2,1009	2,4450	2,8784	3,1966
19	0,68763	1,1866	1,7291	2,0930	2,4334	2,8609	3,1737
20	0,68696	1,1848	1,7247	2,0860	2,4231	2,8453	3,1531
21	0,68635	1,1831	1,7207	2,0796	2,4138	2,8314	3,1352
22	0,68580	1,1816	1,7171	2,0739	2,4055	2,8193	3,1188
23	0,68531	1,1802	1,7139	2,0687	2,3979	2,8073	3,1040
24	0,68485	1,1789	1,7109	2,0639	2,3910	2,7960	3,0905
25	0,68443	1,1777	1,7081	2,0595	2,3846	2,7871	3,0782
26	0,68405	1,1766	1,7056	2,0555	2,3788	2,7787	3,0669
27	0,68370	1,1757	1,7033	2,0518	2,3734	2,7707	3,0565
28	0,68335	1,1749	1,7011	2,0484	2,3685	2,7633	3,0469
29	0,68304	1,1739	1,6991	2,0452	2,3638	2,7564	3,0380
30	0,68276	1,1731	1,6973	2,0423	2,3596	2,7500	3,0298
40	0,68066	1,1673	1,6839	2,0211	2,3289	2,7045	2,9712
60	0,67862	1,1616	1,6707	2,0003	2,2991	2,6603	2,9146
120	0,67656	1,1559	1,6577	1,9799	2,2699	2,6174	2,8599
∞	0,67449	1,1503	1,6449	1,9600	2,2414	2,5753	2,8070

1.5.3 - Prueba a una cola versus prueba a dos colas

La elección de realizar un test a una cola o dos está asociada con la hipótesis alternativa propuesta. Por ejemplo, cuando se plantea la hipótesis de que dos medias son distintas, se usa una prueba a dos colas. En cambio, cuando se plantea la hipótesis de que una media es mayor que otra se plantea una hipótesis a una sola cola; en este caso, se está presuponiendo la dirección de la diferencia.

Es de destacar que la Tabla 1 es para un ensayo a dos colas. Si se realiza una prueba a una cola, los niveles de significación que encabezan la Tabla 1 deben dividirse por dos.

2 - ESTABILIDAD DEL ACIDO SORBICO

El cálculo de las constantes de velocidad (k) de la destrucción del sorbato de potasio así como las del incremento de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo de almacenamiento se realizó por regresión lineal.

En el caso de la destrucción del sorbato de potasio, ésta sigue una cinética de primer orden. En consecuencia, la expresión que representa la retención de este preservador en función del tiempo es:

$$\ln c_i / c_0 = -k \cdot t_i \quad (17)$$

donde: c_i = concentración de sorbato de potasio al tiempo t_i
 c_0 = concentración inicial de sorbato de potasio
 k = constante de velocidad
 t_i = tiempo

La ecuación anterior se puede expresar en la forma:

$$\ln c_i = \ln c_0 + k' \cdot t = a + b \cdot t_i \quad (18)$$

donde: $k' = -k$
 a = ordenada al origen
 b = pendiente

En el caso de las reacciones de pardeamiento no enzimático, éstas fueron evaluadas mediante el aumento de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo de almacenamiento, cuya expresión cinética mostró ser de orden cero:

$$\text{Abs a } 420 \text{ nm}_i / \text{Abs a } 420 \text{ nm}_o = k \cdot t_i \quad (19)$$

donde: Abs a 420 nm_i = Absorbancia a 420 nm al tiempo t_i
 Abs a 420 nm_o = Absorbancia inicial a 420 nm
 k = constante de velocidad
 t_i = tiempo

La ecuación anterior se puede expresar en la forma:

$$\text{Abs a } 420 \text{ nm}_i = \text{Abs a } 420 \text{ nm}_o + k \cdot t = a' + b' \cdot t_i \quad (20)$$

donde: a' = ordenada al origen
 b' = pendiente

La dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura, para ambas reacciones, ajustó al modelo de Arrhenius:

$$k = k_o \cdot e^{-E_a/RT} \quad (21)$$

donde: k_o = factor de frecuencia (tiempo⁻¹)
 E_a = energía de activación (Kcal/mol)
 T = temperatura absoluta (K)
 R = constante de los gases ideales
 (1,987 · 10⁻³ Kcal/mol K)

Esta ecuación puede ser linealizada como:

$$\ln k = \ln k_o - E_a / RT \quad (22)$$

La misma se puede expresar en la forma:

$$\ln k = a'' + b'' / T \quad (23)$$

donde: a'' = ordenada
 b'' = pendiente

2.1 - Regresión lineal (Sokal y Rohlf, 1969)

Los parámetros a y b de las ecuaciones (18), (20) y (23) fueron estimados mediante una regresión lineal modelo I. Esta se basa en las siguientes suposiciones:

- 1) La variable independiente X es medida sin error y la variable dependiente Y es una variable aleatoria.
- 2) El valor esperado de la variable Y para un dado valor de X está descrito por la función lineal: $y = \alpha + \beta X$
- 3) Para cualquier valor de la variable independiente X, los valores de la variable dependiente Y son independientes y están normalmente distribuidos. Esta suposición puede ser representada por la ecuación: $Y = \alpha + \beta X + \epsilon$, donde ϵ , el error, se supone que presenta una distribución normal con media cero.
- 4) Todas las muestras, a lo largo de la línea de regresión, son homocedásticas, es decir tienen una varianza común, σ^2 , que es la varianza del error. Esta suposición implica que se asume que la varianza alrededor de la línea de regresión es constante e independiente de la magnitud de X o Y.

Con respecto a la suposición (1), en este trabajo, las variables independientes estudiadas fueron tiempo y temperatura, las mismas no están exentas de error, sin embargo, éste se puede considerar despreciable en relación al error asociado a las variables dependientes analizadas que fueron concentración de sorbato de potasio, absorbancia a 420 nm y las constantes cinéticas correspondientes.

El propósito del análisis de regresión es establecer si la relación entre las variables analizadas, puede ser descrita por un regresión lineal de la forma:

$$Y = a + b \cdot X \quad (24)$$

El criterio para estimar la recta de regresión es el principio de cuadrados mínimos. En base a esto, se define como recta de regresión a la que representa los valores de una variable llamada variable dependiente (Y), en función de una variable llamada independiente (X) y tal que la suma de los cuadrados de la desviación de la variable dependiente, en relación con esta recta, sea mínima.

La recta de regresión indica para cada valor de la variable independiente X_i , el valor estimado de la variable dependiente, Y_{est} :

$$Y_{est} = a + b \cdot X \quad (25)$$

Siendo: a = ordenada al origen estimada
b = pendiente estimada o coeficiente de regresión

2.1.1 - Cálculo de los parámetros de la recta de regresión

a) Cálculo del coeficiente de regresión

$$b = \Sigma x.y / \Sigma x^2 \quad (26)$$

donde: $\Sigma x.y$ = suma de los productos de las desviaciones de las X respecto de la media de X, por las desviaciones de las Y respecto de la media de Y, es decir:

$$\Sigma x.y = \Sigma (X - X_m) . (Y - Y_m) \quad (27)$$

b) Cálculo de la ordenada al origen de la recta de regresión

$$a = Y_m - b . X_m \quad (28)$$

2.1.2 - Bondad del ajuste

Una vez hallada la recta de regresión es necesario evaluar la bondad del ajuste. Para ello se aplicaron dos criterios:

- * Análisis de varianza sobre la regresión
- * Coeficiente de determinación

2.1.2.1 - Análisis de la varianza sobre la regresión (Sokal y Rohlf, 1969)

El análisis de varianza permite establecer si las variaciones de la variable dependiente Y son debidas, fundamentalmente, a las variaciones de la variable independiente X o si son debidas a otras causas no identificables.

En el análisis se considera que la variación total de los valores de Y puede ser segregada en dos categorías, una debida a la influencia de X sobre Y (suma de cuadrados explicada) y otra debida al efecto de otros factores (suma de cuadrados no explicada).

La variación total del conjunto de datos se denomina Suma de cuadrados Totales (SST) y se obtiene sumando los cuadrados de las desviaciones del valor observado Y_i respecto de la media Y_m . La fórmula de cálculo correspondiente es:

$$SST = \sum_{n=1}^n (Y_i - Y_m)^2 \quad (29)$$

La suma de cuadrados totales tiene asociada (n-1) grados de libertad, ya que existe la siguiente restricción:

$$\sum Y_i - Y_m = 0 \quad (30)$$

Podemos decir, entonces, que la suma de cuadrados totales puede dividirse en dos contribuciones:

- * Suma de cuadrados debida a la regresión (SSR)
- * Suma de cuadrados residual (SSE)

La suma de cuadrados debida a la regresión, también llamada suma de cuadrados explicada, representa la variación de los valores de Y debida a la variación de los valores de X, es decir, la variación explicada por la ecuación que relaciona ambas variables. Esta suma representa la desviación del valor estimado por la recta de regresión respecto de la media. Su fórmula de cálculo es:

$$SSR = \sum_{n=1}^n (Y_{cst} - Y_m)^2 \quad (31)$$

La suma de cuadrados debida a la regresión tiene asociada (p-1) grados de libertad, siendo p el número de parámetros utilizados para describir la relación entre la variable independiente y la variable dependiente, en este caso, el número de grados de libertad es uno.

La suma de cuadrados residual (SSE), también llamada suma de cuadrados no explicada o error, representa las variaciones debidas a causas no identificables. Se define como la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores medidos respecto de los valores estimados por la recta de regresión y se calcula según la siguiente ecuación:

$$SSE = \sum_{n=1}^n (Y - Y_{cst.})^2 \quad (32)$$

Esta suma de cuadrados tiene asociados (n-p) grados de libertad, donde n es el número de valores medidos.

En la Tabla 2 se resume la información para realizar el análisis de varianza.

Tabla 2 : Parametros de un ANOVA

Fuente	g.l	Suma de cuadrados	Media de cuadrados
Debido a la regresión	p-1	SSR	MSR = SSR/p-1
Residual	n-p	SSE	MSE = SSE/n-p
Total	n-1	SST	

Para establecer la significatividad de la ecuación de regresión se realiza un test de hipótesis sobre el coeficiente de regresión. En dicho test se plantea la hipótesis nula (H_0): $\beta = 0$ y una hipótesis alternativa (H_1): al menos un valor de β es distinto de cero. Para la realización de este test se utiliza el estadístico F_r . El mismo se calcula según la siguiente fórmula:

$$F_r = \text{MSR} / \text{MSE} \tag{33}$$

Se compara el valor obtenido del cálculo del estadístico F_r el con el extraído de la Tabla 3 para (p-1) y (n-p) grados de libertad y el nivel de significación (α) elegido (en este trabajo, se empleó un $\alpha = 0,05$). Si el valor calculado es mayor que el tabulado se rechaza la hipótesis nula y se concluye que la variación de la variable Y explicada por la recta de regresión es significativamente mayor que la variación debida a causas no identificables. Por el contrario si el valor calculado es menor al tabulado, no se puede rechazar la hipótesis nula y no existe evidencia de que el coeficiente de regresión sea significativamente distinto de cero.

2.1.2.2 - Coeficiente de determinación (Draper y Smith, 1981)

El coeficiente de determinación (R^2) mide la proporción de la variación total de los valores de Y con respecto a la media que son explicados por la recta de regresión. Se calcula según la siguiente fórmula:

$$R^2 = \text{SSR} / \text{SST} \tag{34}$$

Tabla 3: Valores del estadístico F_{α} significativos al nivel del 5 %

$b \backslash n_2 \backslash n_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	12	24	
1.....	141.40	199.50	215.70	224.60	230.20	234.00	236.90	238.00	243.20	249.10	254.20
2.....	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.41	19.45	19.50
3.....	10.13	9.55	9.29	9.12	9.01	8.91	8.89	8.95	8.74	8.64	8.53
4.....	7.71	6.94	6.57	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	5.91	5.77	5.63
5.....	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.69	4.53	4.38
6.....	5.99	5.14	4.75	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.00	3.84	3.67
7.....	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.72	3.57	3.41	3.23
8.....	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.29	3.12	2.93
9.....	5.12	4.25	3.85	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.07	2.90	2.71
10.....	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	2.91	2.74	2.54
11.....	4.81	3.99	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.79	2.61	2.40
12.....	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.69	2.51	2.30
13.....	4.67	3.81	3.41	3.18	3.02	2.92	2.82	2.77	2.60	2.42	2.21
14.....	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.53	2.35	2.13
15.....	4.54	3.68	3.28	3.05	2.90	2.79	2.71	2.64	2.47	2.29	2.07
16.....	4.49	3.63	3.23	3.01	2.85	2.74	2.65	2.59	2.42	2.24	2.01
17.....	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.38	2.19	1.96
18.....	4.41	3.55	3.15	2.92	2.77	2.66	2.57	2.51	2.34	2.15	1.92
19.....	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.31	2.11	1.89
20.....	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.28	2.08	1.86
21.....	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.47	2.42	2.25	2.05	1.81
22.....	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.23	2.02	1.79
23.....	4.28	3.42	3.02	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.20	2.01	1.76
24.....	4.25	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.19	1.99	1.73
25.....	4.24	3.30	2.92	2.74	2.60	2.49	2.40	2.34	2.16	1.96	1.71
26.....	4.23	3.37	2.99	2.74	2.59	2.47	2.37	2.32	2.15	1.95	1.69
27.....	4.21	3.35	2.96	2.72	2.57	2.46	2.37	2.31	2.13	1.93	1.67
28.....	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.12	1.91	1.65
29.....	4.18	3.32	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.29	2.10	1.90	1.64
30.....	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.09	1.89	1.62
40.....	4.09	3.23	2.81	2.61	2.45	2.34	2.25	2.19	2.00	1.79	1.51
60.....	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	1.92	1.70	1.42
120.....	3.92	3.07	2.69	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.82	1.61	1.35
.....	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.75	1.52	1.09

b_{n1} : grados de libertad del numerador

b_{n2} : grados de libertad del denominador

En general se lo expresa como porcentaje. Los valores de R^2 pueden ser cercanos a 1, pero nunca alcanzan el valor de 1, ya que en toda experimentación siempre hay alguna fuente de error.

2.1.3 - Error estándar e intervalo de confianza de los parámetros de la recta de regresión (Draper y Smith, 1981)

Debido a que los valores a y b están basados en una muestra dada de n observaciones y son sólo estimaciones de los parámetros verdaderos α y β ; resulta de interés establecer la precisión en la estimación de a y b . Para ello se calculan sus errores estándar.

En cuanto al coeficiente de regresión, el error o desviación estándar se calcula según la siguiente fórmula:

$$d = \sqrt{\text{MSE}} / \sqrt{\sum (X - X_m)^2} \quad (35)$$

Este es el estimador elegido para expresar el error de los parámetros cinéticos calculados en este trabajo.

Para la ordenada al origen de la recta de regresión, su error estándar se calcula según:

$$d_a = \sqrt{\text{MSE} \cdot \sum X^2} / \sqrt{n \cdot \sum (X - X_{med})^2} \quad (36)$$

Con el objetivo de conocer el límite inferior y superior de los parámetros de la recta de regresión se calculan los intervalos de confianza de los mismos.

El intervalo de confianza del coeficiente de regresión se calcula según la siguiente fórmula:

$$\beta = b \pm t_{\alpha/2, (n-2)} d \quad (37)$$

El intervalo de confianza de la ordenada al origen de la recta de regresión se calcula según la siguiente fórmula:

$$\alpha = a \pm t_{\alpha/2, (n-2)} d_a \quad (38)$$

La cantidad $t_{\alpha/2, (n-2)}$ corresponde al estadístico t . Su valor se obtiene de tablas a partir del valor del nivel de significación $\alpha/2$ y de n grados de libertad del sistema.

2.1.4 - Análisis de covarianza (Sokal y Rohlf, 1969)

El análisis de covarianza (ANCOVA) permite determinar si las pendientes de diferentes rectas de regresión provienen de poblaciones con la misma pendiente. Esta prueba estudia si las medias de la variable dependiente son significativamente diferentes entre grupos, y si estas diferencias son debidas a las diferencias de la variable independiente entre los grupos. Básicamente, el test se basa en establecer una recta de regresión común al grupo de medias de Y y establecer si la heterogeneidad alrededor de la recta de regresión es significativa.

Las condiciones que debe cumplir la variable dependiente Y, para realizar un análisis de covarianza son (Lison, 1976):

- 1) Que haya una regresión de las Y sobre las X.
- 2) Que sea lineal.
- 3) Que la variación de X no esté condicionada por la de Y.

En cuanto a la variable independiente (X), no es necesario que ésta varíe linealmente ni que tenga una distribución normal (Lison, 1976).

En el análisis se considera que la variación total de los valores de Y puede ser segregada en dos categorías, una debida a las variaciones entre regresiones (suma de cuadrados entre regresiones) y otra debida al promedio ponderado de las desviaciones dentro de cada una de las regresiones (suma de cuadrados residuales de cada regresión).

La suma de cuadrados entre regresiones (SSAR) se calcula según la siguiente fórmula:

$$SSAR = \sum_{k=1}^k (\sum Y_{est}^2) - \sum Y_{estcomún}^2 \quad (39)$$

donde: k = número de pendientes

$$Y_{est} = Y_{est} - Y_m$$

$$Y_{estcomún} = Y_{estcomún} - Y_{mcomún}$$

Esta suma de cuadrados entre pendientes tiene asociada (k-1) grados de libertad.

El promedio ponderado de las desviaciones dentro de cada una de las regresiones (suma de cuadrados residual o no explicada dentro de cada regresión SSIE) representa las variaciones debidas a causas no

identificables dentro de cada regresión y se obtiene realizando la sumatoria de la suma de cuadrados residuales de cada regresión. Su fórmula de cálculo es:

$$SSIE = \sum_{k=1}^k (\sum SSE) \quad (40)$$

Esta suma de cuadrados tiene asociada $(\sum a - 2 \cdot k)$ grados de libertad, siendo a = número de pares de valores X, Y de cada una de las rectas de regresión.

En la Tabla 4 se resume la información para realizar el análisis de covarianza.

Tabla 4: Parámetros de un ANCOVA

Fuente	g.l	Suma de cuadrados	Media de cuadrados
Variación entre regresiones	$k-1$	SSAR	$MSAR = SSAR/k-1$
Desviaciones dentro de cada regresión	$(\sum a - 2 \cdot k)$	SSIE	$MSIE = SSIE/(\sum a - 2 \cdot k)$

Para establecer si existen diferencias significativas entre los coeficientes de regresión se realiza un test de hipótesis sobre el coeficiente de regresión. En dicho test se plantea la hipótesis nula (H_0): $\beta = \beta$ común y una hipótesis alternativa (H_1): al menos un valor de β es distinto de β común. Para la realización de este test se utiliza el estadístico F_1 . El mismo se calcula según la siguiente fórmula:

$$F_1 = MSAR/MSIE \quad (41)$$

Se compara el valor obtenido del cálculo del estadístico F_1 con el extraído de la tabla 3 para $(k-1)$ y $(\sum a - 2 \cdot k)$ grados de libertad y el nivel de significación (α) elegido (en este trabajo, se empleó un $\alpha = 0,05$). Si el valor calculado es mayor que el tabulado se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre las pendientes al nivel de probabilidad fijado.

Por el contrario, si el valor calculado es menor al tabulado, no se puede rechazar la hipótesis nula y existe evidencia de que todos los grupos provienen de poblaciones con igual pendiente, es decir, no hay diferencias significativas entre las pendientes al nivel de probabilidad fijado γ , por lo tanto, el coeficiente de regresión promedio es un estimador de la pendiente común de los distintos grupos.

Una vez establecida la existencia de diferencias significativas entre distintos coeficientes de regresión, resulta de interés establecer cuáles de ellos son diferentes entre sí. Para ello, se debe calcular nuevamente la suma de cuadrados entre el grupo de pendientes de interés y la suma de cuadrados residual o no explicada, dentro de cada regresión (SSIE) y proceder en forma análoga a la ya mencionada. Si mediante la aplicación del estadístico F se concluye que hay diferencias significativas entre las pendientes analizadas, se debe ir reduciendo el número de coeficientes de regresión a comparar a fin de establecer cuáles de ellas presentan diferencias significativas. Por el contrario, si el test F indica que no existen diferencias significativas entre el grupo de coeficientes de regresión de interés, se puede asegurar que no hay diferencias entre ninguna de ellas, al nivel de probabilidad elegido.

En el caso de tener interés en establecer si existen diferencias significativas entre sólo dos coeficientes de regresión, se puede utilizar un test F cuya fórmula, que surge de la simplificación del análisis anteriormente expuesto, es:

$$F_s = \frac{(b_1 - b_2)^2}{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{(\sum x_1^2)(\sum x_2^2)} \cdot SSIE} \quad (42)$$

donde b_1 y b_2 son los dos coeficientes de regresión a comparar.

$$SSIE = \frac{\sum y_1^2 - (\sum xy)_1^2 / \sum x_1^2 + \sum y_2^2 - (\sum xy)_2^2 / \sum x_2^2}{a_1 + a_2 - 4}$$

donde: a_1 y a_2 representan el número de pares de valores X,Y de cada una de las rectas de regresión.

Una vez calculado el estadístico F, se compara con el $F_{\alpha(1, a_1 + a_2 - 4)}$ obtenido de tablas. Si F, es mayor al tabulado, se concluye que los coeficientes de regresión comparados presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad fijado.

2.2 - Correlación (Steel y Torrie, 1960)

Para establecer la existencia de una correlación entre la disminución del logaritmo natural de la retención porcentual de sorbato de potasio y el incremento de la absorbancia a 420 nm se calculó el coeficiente de correlación (r).

El coeficiente de correlación muestral (r), es una estimación del coeficiente de correlación poblacional (Ω) y representa el grado de asociación entre dos variables (X e Y). Se calcula mediante la siguiente expresión:

$$r = \Sigma x.y / \sqrt{\Sigma x^2.y^2} \quad (43)$$

Su cálculo asume que entre las variables existe una relación lineal.

El rango de valores de r abarca desde +1 (correlación positiva perfecta) hasta -1 (correlación negativa perfecta).

A fin de establecer si el coeficiente de correlación obtenido es significativo, para un dado nivel de probabilidad, se realiza un test de hipótesis sobre el coeficiente de correlación, para ello se plantea una hipótesis nula, H_0 : no existe correlación alguna entre ambas variables ($\Omega = 0$). Para el caso de muestras pequeñas, se utiliza un test t cuyo estadístico es:

$$t_r = r \cdot (\sqrt{n-2} / \sqrt{1-r^2}) \quad (44)$$

Con el empleo de la Tabla 1 se compara el valor obtenido del cálculo del estadístico t con el extraído de la tabla para (n-2) grados de libertad y el nivel de significación (α) elegido (en este trabajo, se empleó un $\alpha = 0,05$). Si el valor calculado es menor que el tabulado se acepta la hipótesis nula (la correlación no es significativa al nivel de probabilidad elegido). Por el contrario si el valor calculado es mayor al tabulado, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que al nivel de probabilidad elegido existe una correlación entre las variables.

10 - BIBLIOGRAFIA

Alderton, G. y Lewis, J. C. 1958. Determination of sorbic acid and its disappearance from pickle brines. *Food Res.* **23**, 338.

Ali, M. S. 1985. Rapid quantitative method for simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid and four parabens in meat and nonmeat products by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 488.

Alzamora, S. M., Gerschenson, L. N., Cerruti, P. y Rojas, A. M. 1989. Shelf stable pineapple for long term non-refrigerated storage. *Lebensm.-Wiss u Technol.* **22**, 233.

AOAC 1980. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Argaíz, A., Vergara, A., Welte, J. y Lopez Malo, A. 1993. Durazno preservado por métodos combinados. *Boletín Internacional de Divulgación* nº 1. Ed. J. Welte, F. Vergara Balderas, P. Cortes Salazar y L. Lopez Leal. Universidad de las Américas, Puebla.

Arya, S. S. 1980. Stability of sorbic acid in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1246.

Arya, S. S y Thakur, B. R. 1988. Degradation products of sorbic acid in aqueous solutions. *Food Chem.* **29**, 41.

Avis, K. E. 1985. Parenteral Preparations: Glass. En *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania.

Baldock, J. D., Frank, P. R., Graham, P. P. y Ivey, F. J. 1979. Potassium sorbate as a fungistatic agent in country ham processing. *J. food Prot.* **42**, 780.

Bandelin, F. J. 1958. The effect of pH on the efficiency of various mold inhibiting compounds. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **47**, 691.

Berry, B. W. y Blumer, T. N. 1981. Sensory, physical, and cooking characteristics of bacon processed with varying levels of sodium nitrite and potassium sorbate. *J. Food Sci.* **46**, 321.

Betts, A. T. y Uri, N. 1966. The conversion of metal catalysts into inhibitors of autoxidation. *Makromol. Chemie.* **95**, 22.

Beuchat, L. R. 1976. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssochlamys nivea* ascospores. *Mycopathologia*. **59**, 175.

Beuchat, L. R. 1981. Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 472.

Beuchat, L. R. 1987. Influence of water activity on sporulation, germination outgrowth, and toxin production. En: *Water Activity: Theory and Applications to Foods*. Ed. L. B. Rockland y L. R. Beuchat. Marcel Dekker, Nueva York.

Binker, E. F. y Kolari, O. E. 1975. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. *Food Cosmet. Toxicol.* **13**, 655.

Blaedel, W. J. y Meloche, V. W. 1963. *Elementary Quantitative Analysis Theory and Practice*. Harper and Dow, Nueva York.

Blocher, J. C. y Busta, F. F. 1985. Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 469.

Bolin, H. R., King, A. D. y Stafford, A. E. 1980. A research note: Sorbic acid loss from high moisture prunes. *J. Food Sci.* **45**, 1434.

Bolin, H. R., Stafford, A. E. y Flath, R. A. 1984. Increased specificity in sorbic acid determination in stored dried prunes. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 683.

Braverman, J. B. 1967. *Introduction to biochemistry of foods*. Elsevier Publishing Company, Nueva York.

Brunnemann, K. D. 1980. Routine high performance liquid chromatographic method for assessing sorbate in tobacco. *J. Chromatogr.* **202**, 494.

Buera, M. P., Chirife, J., Resnik, S. y Lozano, R. 1984. Estudio comparativo de la reactividad de diferentes azúcares frente a las reacciones de pardeamiento no enzimático en sistemas modelo líquidos de alta actividad acuosa. *Anales, Segundo simposio de color en alimentos*, Buenos Aires.

Buera, M. P. 1986. Cinética de las reacciones de pardeamiento no enzimático entre azúcares y glicina en soluciones de alta actividad de agua. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Buera, M. P., Chirife, J, Resnik, S. y Wetzler, G. 1987. Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: Kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning. *J. Food Sci.* **52**, 1063.

Bui, L. V. y Cooper, H. 1987. Reverse-phase liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 892.

Bullerman, L. B. 1983. Effect of potassium sorbate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.* **46**, 940.

Bullerman, L. B. 1984. Effect of potassium sorbate on growth and patulin production by *Penicillium roqueforti* and *Penicillium patulum*. *J. Food Prot.* **47**, 312.

Bullerman, L. B. 1985. Effects of potassium sorbate on growth and ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium species*. *J. Food Prot.* **48**, 162.

Burriel Martí, F., Lucena Conde, F. y Arribas Jimeno, S .1985. *Química Analítica Cualitativa*, Editorial Paraninfo, Barcelona.

Cerruti, P., Resnik, S. L., Seldes, A. y Ferro Fontán, C. 1985. Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: glucose loss, 5-hydroxymethyl-furfural accumulation and fluorescence development due to non-enzymatic browning. *J. Food Sci.* **50**, 627.

Ciaccio, L. L. 1966. Determination of potassium sorbate in low-calorie salad dressings. *Food Technol.* **20**, 73.

Clegg, K. M. 1964. Non enzymic browning of lemon juice. *J. Sci. Food Agric.* **15**, 878.

Coelho, R. G. y Nelson, D. L. 1983. Rapid extraction and gas-liquid chromatographic determination of benzoic and sorbic acids in beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**, 209.

Cole, S. J. 1967. The maillard reaction in food products. Carbon dioxide production. *J. Food Sci.* **32**, 245.

Corona Salas, R. 1994. Evaluation of the elaboration process and stability of figs (*Ficus, carica* L) using the combined methods of preservation. Anales Sesión de Posters. *International Symposium on the Properties of Water, Practicum II*, Puebla.

Corry, J. E. L. 1987. Relationship of water activity to fungal growth. En *Food beverage and mycology*. Ed. L. R. Beuchat. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.

Cheftel, J. C. y Cheftel, H. 1976. *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza.

Chichester, D. F. y Tanner, F. W. 1975. Antimicrobial Food Additives. En: *Handbook of food additives*. Ed. T. E. Furia. CRC Press, Cleveland.

Chirife, J. y Ferro Fontán. 1980. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. V. Experimental investigations of the a_w lowering behavior of sodium lactate and some related compounds. *J. Food Sci.* **45**, 802.

Chirife, J., Ferro Fontán, C. y Benmergui, E. A. 1980. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV. a_w prediction in aqueous non electrolyte solutions. *J. Food Technol.* **15**, 59.

Chirife, J. y Resnik, S. 1984. Unsaturated solutions as references sources of water activity at various temperatures. *J. Food Sci.* **49**, 1486.

Christiansen, L. N. Tompkin, R. B., Shaparis, A. B., Johnston, R. W. y Kautter, D. A. 1975. Effect of sodium nitrite and nitrate on *Clostridium botulinum* growth and toxin production in a summer style sausage. *J. Food Sci.* **40**, 488.

Chung, Y. M. y Lee, J. S. 1982. Potassium sorbate inhibition of microorganisms isolated from sea foods. *J. Food Prot.* **45**, 1310.

Chuyen, N.V., Kurata, T. y Fujimaki, M. 1973. Studies on the reaction of dipeptides with glyoxal. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 327.

Dai, Y. 1981. Preservatives for oral fluid preparations. *Chem. Abstr.* **95**, 121.095.

Deak, T. y Novak, E. K. 1972. Assimilation of sorbic acid by yeasts. *Chem. Abstr.* **77**, 43.705.

Deibel, R. H. 1979. Parabens, *Anales Meat Ind. Res. Conf. American Meat Institute*, Chicago.

Demaree, G. E., Sjogren, D. W., McCashland, B. W. y Cosgrove, F. P. 1955. Preliminary studies on the effect of feeding sorbic acid on the growth, reproduction and cellular metabolism of albino rats. *J. Am. Pharm. Assoc.* **44**, 619.

Deuel, H. J., Jr., Alfin-Slater, R., Weil, C.S. y Smith, H. F. Jr. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmless of sorbic acid as a dietary component. *Food Res.* **19**, 1.

Di Fate, V. G. 1977. Microbiological mutagenicity evaluation of sorbic acid/sodium nitrite reaction products. Informe elevado al Panel de Expertos sobre nitritos, nitratos y nitrosaminas. *Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Washington.*

Di Sipio, F. 1992. Analisi dell'acido sorbico in matrici alimentari. Estrazione per distillazione in corrente di vapore - purificazione per ripartizione liquido - liquido - dosaggio per spettrofotometria U.V. *Industrie Alimentari.* **31**, 103.

Díaz de Tablante, R. V., Tapia de Daza, M. S., Montenegro, G. y Gonzalez I. 1993. Desarrollo de productos de mango y papaya de alta humedad estabilizados por métodos combinados. *Boletín Internacional de Divulgación nº 1*. Ed. J. Welte, F. Vergara Balderas, P. Cortes Salazar y L. Lopez Leal. Universidad de las Américas, Puebla.

Dinermancy, A. A. y Ignat'ev, A. D. 1967. *Chem. Abstr.* **66**, 18070.

Doyon, L. y Smyrl, T. G. 1983. Interaction of thiamine with reducing sugars. *Food Chem.* **12**, 127.

Draper, N. R. y Smith, H. 1981. *Applied Regression Analysis*. Elsevier Applied Science, Nueva York.

Dymicky, M. y Huhtanen, C. N. 1979. Inhibition of *Clostridium botulinum* by p-hydroxybenzoic acid n-alkyl esters. *Antimicrobiol. Agents Chem.* **15**, 798.

Edinger, W. D. y Splittstoesser, D. F. 1986. Sorbate tolerance by lactic acid bacteria associated with grapes and wine. *J. Food Sci.* **51**, 1077.

Eichner, K. y Karel, M. 1972. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *J. Agric. Food Chem.* **20**, 218.

Eisenbeiss, F., Weber, M. y Ehlerding, S. 1977. Rapid direct determination of sorbic acid in the presence of benzoic acid in wine by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* **10**, 262.

Eklund, T. 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.* **54**, 383.

Ellis, G. P. 1959. The Maillard reaction. *Adv. Carbohydr. Chem.* **14**, 63.

Ellis, R., Curie, G. T., Thornton, F. E., Bollinger, N. C. y Gaddis, A. M. 1968. Carbonyls in oxidizing fat.11.The effect of the pro-oxidant activity of sodium chloride on pork tissue. *J. Food Sci.* **33**, 555.

Emard, L. O. y Vaughn, R. H. 1952. Selectivity of sorbic acid media for catalase negative lactic acid bacteria and clostridia. *J. Bacteriol.* **63**, 487.

Emerick, R. J., Nelson, D. L. y Olson, D. E. 1963. Effects of nitrate and some of its reduction products on carotene stability. *J. Agric. Food Chem.* **11**, 140.

Ferguson, W. E. y Powrie, W. D. 1957. Studies on the preservation of fresh apple juice with sorbic acid. *Appl. Microbiol.* **5**, 41.

Fernholz, H. 1961. Patente alemana 1.044.803; *Chem. Abstr.* **55**, 3439.

Fernholz, H., Schimdt, H. J. y Wunder, F. 1975. Patente alemana, 2.331.668; *Chem. Abstr.* **82**, 155.370

Fernholz, H. y Liberda. 1975. *Chem. Abstr.* **82**, 155.371

Ferro Fontán, C., Chirife, J. y Benmergui, E. A. 1979. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. I. a_w prediction in single aqueous electrolyte solutions. *J. Food Technol.* **14**, 625.

Fingerhurt, M., Schmidt, B. y Lang, K. 1962. Metabolism of sorbic acid- ^{14}C . *Biochem. Z.* **336**, 118

Fino, M. L., Marth, E. H. y Lindsay, R. C. 1982. Depletion of sorbate from different media during growth of *Penicillium* species. *J. Food Prot.* **45**, 398.

Fodor, G., Arnold, R. y Mohacsi, T. 1983. A new role for L-ascorbic acid: Michael donor to α,β -unsaturated carbonyl compounds. *Tetrahedron.* **39**, 2137.

Fox, M. y Loncin, M. 1982. Investigation into the microbiological stability of water-rich foods processed by a combination of methods. *Lebensm. Wiss u Technol.* **15**, 321.

García, A. V., Sevillano, E., Castro, D., Acosta, V., García, A., Casals, A., Casals, C., Fernandez, C. y Nuñez, M. 1993. Conservación de pulpa de guayaba por métodos combinados. *Boletín Internacional de Divulgación* nº 1. Ed. J. Welte, F. Vergara Balderas, P. Cortes Salazar y L. Lopez Leal. Universidad de las Américas, Puebla.

Gareis, M., Bauer, J., von Montegelas y Gedek, B. 1984. Stimulation of aflatoxin B₁ and T-2 toxin production by sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 416.

Gaunt, I. F., Butterworth, K. R., Hardy, J. y Gangolli, S. D. 1975. Long-term toxicity of sorbic acid in the rat. *Food Cosmet. Toxicol.* **13**, 31.

Geahchan, A. Pierson, M. y Chambou, P. 1979. Gas chromatographic determination of preservatives in rennet. *J. Chromatogr.* **176**, 123.

Gerschenson, L. N., Alzamora, S. M. y Chirife, J. 1986. Stability of sorbic acid in model food systems of reduced water activity: sugar solutions. *J. Food Sci.* **51**, 1028.

Gerschenson, L. N., Alzamora, S. M. y Chirife, J. 1987. Effect of sodium Chloride and glycerol on the stability of sorbic acid solutions at reduced water activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **20**, 98.

Glasstone, S. 1952. *Elementos de fisico - química*. Editorial Médico quirúrgica, Buenos Aires.

Gould, G. W., Brown, M. H. y Fletcher, B. C. 1983. Mechanism of action of food preservation procedures. En: *Food Microbiology, Advances and Prospects*. Ed. T. A. Roberts y F. A. Skinner. Academic Press, Nueva York.

Gourama, H. y Bullerman, L. B. 1988. Effect of potassium sorbate and natamycin on growth and penicillic acid production by *Aspergillus ochraceus*. *J. Food Prot.* **51**, 139.

Gray, R. H. J., Elliot, P. H. y Tomlins, R. I. 1984. Control of the two major pathogens of fresh poultry using a combination of potassium sorbate/carbon dioxide packaging treatment. *J. Food Sci.* **49**, 142.

Greer, G.G. 1982. Mechanism of beef shelf life extension by sorbate. *J Food Prot.* **45**, 82.

Griffith, T. y Johnson, J. A. 1957. Relation of the browning reaction to storage stability of sugar cookies. *Cereal Chem.* **34**, 159.

Grinstead, R. R. 1960. Oxidation of salicylate by the model peroxidase catalyst iron-ethylendiaminetetraaceto-iron (III) acid. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 3472.

Guerrero, S., Alzamora, S.M. y Gerschenson, L. N. 1990. Stability of sorbic acid in aqueous solutions of sodium chloride. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **23**, 271.

Guerrero, S. N. 1993. Desarrollo de una tecnología de factores combinados para preservar puré de banana de alta humedad. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Häglund, H. y Ringbom, A. 1926. Über die sulfitaddition an ungesättigte verbindungen. *Z. Anorg. Allgem. Chem.* **150**, 231.

Handsack, W. 1963. Determination of sorbic acid with thiobarbituric acid. *Nahrung.* **7**, 155.

Harrington, W. O., Anne, S. J. y Hills, C. H. 1962. Spectrophotometric determination of sorbic acid in apple cider. *J. Food Sci.* **27**, 15.

Hartmann, P. E. 1983. Putative mutagens and carcinogens in foods. *Environmental mutagenesis*. **5**, 217.

Heintze, K. 1976. Über die gegenseitige Beeinflussung von Sorbinsäure und Schwefelwasserstoff. *Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung*. **61**, 555.

Heintze, K. 1971. Stability of sorbic acid. *Lebensm. Wiss. Technol.* **4**, 64.

Hendel, T. P. y Stalmarch, M. 1955. Rates of non-enzymatic browning of white potato during dehydration. *J. Food Technol.* **9**, 433.

Hendy, R. J., Hardy, J., Gaunt, I., Kiss, I. S. y Butterworth, K. R. 1976. Long-term toxicity studies of sorbic acid in mice. *Food Cosmet. Toxicol.* **14**, 381.

Hildegard, M. y Sabalitscka, T. H. 1965. Instability of sorbic acid. IV: Stabilization of sorbic acid by propylgallate. *Seifen, Öle, Fette, Wachse*. **91**, 720.

Hodge, J. E. 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928.

Hodge, J. E. y Osman, E. M. 1976. Carbohydrates. En: *Principles of Food Science*. Ed. O. R. Fennema. Marcel Dekker Inc., Nueva York.

Holley, R. A. y Millard, G. E. 1980. Ultraviolet spectrophotometric determination of sorbic acid in dried fermented sausages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 1332.

Horwood, J. K., Lloyd, G. T., Ramshaw, E. H. y Stark, W. 1981. An off flavor associated with the use of sorbic acid during feta cheese maturation. *J. Dairy Technol.* **36**, 38.

Huhtanen, C. N. Feinberg, J., Trenchard, H. y Philips, J. G. 1983. Acid enhancement of *Clostridium botulinum* inhibition in ham and bacon preparations with potassium sorbate and sorbic acid. *J. Food Prot.* **46**, 807.

Huhtanen, C. N. y Feinberg, J. 1980. Sorbic acid inhibition of *Clostridium botulinum* in nitrite-free poultry frankfurters. *J. Food Sci.* **45**, 453.

- Ingold, K. U. 1961. Inhibition of the autoxidation of organic substances in the liquid phase. *Chem Rev.* **61**, 563.
- Ishibashi, C. Kido, Y., Urabuko, G. y Sato, K. 1972. Studies on radiolysis of food additives.1. Radiolysis of sorbic acid in aqueous solution and antibacterial activity of irradiated solution. *J. Hygienic Chem.* **18**, 337.
- Ivey, F.J. y Robach, M. C. 1978. Effect of sorbic acid and sodium nitrite on *Clostridium botulinum* outgrowth and toxin production in canned comminuted pork. *J. Food Sci.* **43**, 1782.
- Ivey, F. J., Shaver, K. J., Christiansen, L. N, y Tompkin, R. B. 1978. Effect of potassium sorbate on toxicogenesis of *Clostridium botulinum* in bacon. *J. Food Prot.* **41**, 621.
- Izumi, K. 1992. Reaction of nitrite with ascorbic acid or ascorbic acid-2-derivates. *J. Food. Sci.* **57**, 1066.
- Juven, R. 1976. Bacterial spoilage of citric products of pH lower than 3,5. *J. Milk Food Technol.* **39**, 819.
- Kanterewicz, R. J., Chirife, J. y Lagarde, E. A. 1985. Preservation of concentrated cheese whey by combined factors. *J. Food Sci.* **50**, 1629.
- Katchalsky, A. y Sharon, N. 1953. Kinetics of aldose-aminoacids or peptides. *Biochem J.* **35**, 1024.
- Kerr, F. E. 1966. Patente inglesa 1.006.352; *Chem. Abstr.* **64**, 1699.
- Kirchoff, F. 1975. Patente alemana 2.310.163. *Chem. Abstr.* **82**, 47.471.
- Kitic, D., Favetto, G. J., Chirife, J. y Resnik, S. L. 1986. Measurement of water activity in the intermediate moisture range with the Novasina Thermoconstanter Humidity Meter. *Lebesm.-Wiss u Technol.* **19**, 297.
- Kito, Y., Namiki, M. y Tsuji, K. 1978. A new N-nitropyrrole, 1,4 - Dinitro 2 -methylpyrrole, formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Tetrahedrom*, **34**, 505.

Klis, J. B., Witter, L. D. y Ordal, Z. J. 1958. Action of different fungicidal antibiotics on the growth of common fungi spoil foods. *Food Technol.* **13**, 124.

Kwandelwal, G. D. y Wedzicha, B. L. 1990. Nucleophilic reactions of sorbic acid. *Food additives and Contaminants.* **7**, 685.

Kyrtopoulus, S. 1987. Ascorbic acid and the formation of N-nitroso compounds: possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 1344.

Labuza T. P., Warren, R. y Warmbier, J. 1977. The physical aspects with respect to water and non-enzymatic browning. *Adv. Exp. Med. Biol.* **86B**, 379.

Labuza, T. P. 1980. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technol.* **34**, 36.

Labuza, T. P. y Stalmarch, M. 1980. The non-enzymatic browning reactions affected by water in foods. En *Properties of Water related to Food Quality and Stability*. Ed. L. B. Rockland y G. F. Steward. Academic Press, San Francisco.

Labuza, T. P. y Riboh, D. 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technol.* **36**, 66.

Labuza, T. P. y Kamman, J. K. 1983. Reaction kinetics and accelerated tests simulation as a function of temperature. En: *Computer aided techniques in food technology*. Ed. I. Saguy. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

Lang, K. 1980. Tolerance to sorbic acid. En: *Antimicrobial Food Additives*. Springer-Verlag, Nueva York.

Larocco, K. A. y Martin, S. E. 1981. Effects of potassium sorbate alone and in combination with sodium chloride on the growth of *Salmonella typhimurium* 7136. *J. Food Sci.* **46**, 499.

Larsson, B. K. 1983. Gas liquid chromatographic determination of benzoic acid and sorbic acid in foods: NMKL Nordic Committee on Food Analysis collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**, 775.

Lawrie, R. A. 1977. *Ciencia de la Carne*. Editorial Acribia, Zaragoza.

Ledward, D. A. 1981. Intermediate moisture meats. En *Developments in Meat Science II*. Ed. R. A. Lawrie. Elsevier Applied Sc. Publishers, Londres.

Lee, S. M., Kim, C. E., Joe, Y. I. y Tank, H. K. 1972. Isolation of sorbic acid from korean dry mountain ash berries. *Chem. Abstr.* **77**, 33.003.

Leistner, L. y Rödel, W. 1975. The significance of water for microorganisms in meat. En: *Water relations in foods*. Ed. R. B. Duckworth. Academic Press, Nueva York.

Leistner, L., Rödel, W. y Krispien, K. 1981. Microbiology of meat products in high and intermediate moisture range. En: *Water activity: Influences on food quality*. Eds. L.B. Rockland y G. F. Steward. Academic Press, Nueva York.

Leistner, L. 1985. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. En: *Properties of water in foods in relation to quality and stability*. Ed. S. Simatos y J. L. Multon. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Leistner, L. 1987. Shelf stable products and intermediate moisture foods based on meat. En *Water activity: Theory and Applications to Food*. Ed. L. B. Rockland y L. R. Beuchat. Marcel Dekker, Nueva York.

Leistner, L. 1992. Food preservation by combined methods. *Food Research International*. **25**, 151.

Lenard, G. 1978. Microbiological study of some liquid non-sterile drugs. *Chem. Abstr.* **88**, 141.613.

Levespiel, O. 1962. *Chemical Reaction Engineering*. J. Willey and Sons, Nueva York.

Lewis, G. N. y Randall, M. 1961. *Thermodynamics*. Mc Graw Hill, Londres.

Liao, M.L. y Seib, P.A. 1988. Chemistry of L-ascorbic acid related to foods. 1988. *Food Chemistry*, **30**, 289.

Licciardello, J. J., Ravesi, E. M., Tuhkunen, B. E. y Racicot, L. D. 1984. Effect of some potentially synergistic treatments in combination with 100 Krad irradiation on the iced shelf life of cod fillets. *J. Food Sci.* **49**, 1341.

Liewen, M. B. y Marth, E. H. 1985. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: A review. *J. Food Prot.* **48**, 364.

Lignert, H. y Ericksson, C. E. 1980. Antioxidative Maillard reaction products. I. Products from sugars and free aminoacids. *J. Food Proc. Pres.* **4**, 161.

Lignert, H. y Lundgren, B. 1980. Antioxidative Maillard reaction products.IV. Application in sausages. *J. Food Process. Preserv.* **4**, 235.

Lignert, H. y Eriksson, C. E. 1981. Antioxidative effect of Maillard reaction products. *Prog. Food Nutr. Sci.* **5**, 453.

Lijinsky, W. y Epstein, S. S. 1970. Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature (London)*. **225**, 21.

Lison, L. 1976. *Estadística Aplicada a la Biología Experimental*. Editorial Eudeba, Buenos Aires.

Loncin, M., Jackmain, D., Tutundjian Provost, A. M., Lenges, J. P. y Bimbenet, J. J. 1965. Influence de l'eau sur les reactions de Maillard. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*. **260**, 3208.

Loza, V. M., Iviet, P. F., Ivanova, T. N. y Beloglazova, L. K. 1969. Solubility of sorbic acid. *Chem. Abstr.* **71**, 69.335.

Lubieniecka-von Shelhorn, M. 1967, a. Distribution of preservatives between fat and water.I Physical-chemical studies. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **131**, 239.

Lubieniecka-von Shelhorn, M. 1967, b. Distribution of preservatives between fat and water.II Relation between physical-chemical distribution and antimicrobial effectiveness of preservatives in fat containing foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **133**, 227.

Lueck, E. 1976. Sorbic acid as a food preservative. *Int. Flavors Food Additives*, **7**, 122.

Lueck, E. 1980. *Antimicrobial Food Additives*. Springer-Verlag, Nueva York.

Mahoney, J. R. y Graf, E. 1986. Role of alpha-tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model systems. *J. Food Sci.* **51**, 1293.

Mandrou, B., Roux, E. y Brun, S. 1977. Volatile constituents disturbing the determination of sorbic acid in wines, fruits, and derived products. *Chem Abstr.* **86**, 3506.

Marshall, D. L. y Bullerman, L. B. 1986. Effect of sucrose esters in combination with selected molds on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.* **49**, 378.

Marth, E. H., Capp, C. M., Hasenzahl, L., Jackson, H. W. y Hussong, R. V. 1966. Degradation of potassium sorbate by *Penicillium species*. *J. Dairy Sci.* **49**, 1197.

Marx, H. y Sabalitschka, T. 1965. Inestabilidad de sorbic acid. IV. Stabilization of sorbic acid by propyl-gallate. *Seifen, Olle, Fette, Wachse.* **91**, 720.

Mauri, L. M. 1988. Efecto del soluto usado para ajustar la actividad de agua en la cinética de degradación de tiamina en sistemas modelo. *Tesis Doctoral*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Mauron, J. 1981. The Maillard reaction in food. A critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Food Nutr. Sci.* **5**, 5.

Maxstadt, J. J. 1972. Rapid spectrophotometric method for the determination of sorbic acid in fresh dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **55**, 7.

Mc Calla, M. A., Mark, F. G. y Kipp, W. H. 1977. High-performance liquid chromatographic determination of sorbic acid in wine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**, 71.

Mc Carthy, T. J., Clarke, C.R. y Myburgh, J. A. 1973. Antibacterial effectiveness of stored sorbic acid solutions. *Cosmet. Pefum.* **88**, 1973.

Mc Carthy, T. J. y Eagler, P. F. K. 1976. Further studies on glass-stored sorbic acid solutions. *Cosmet. Toiletries* **91**, 33.

Meilgaard, M. 1987. *Sensory Evaluation Techniques*. C.R.C. Press, Florida.

Melnick, D., Luckmann, F. H. y Gooding, C. M. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. V. Resistance of sorbic acid in cheese to oxidative degradation. *Food Res.* **19**, 33.

Meschter, E. E. 1953. Fruit color loss. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 574.

Minamitade, M. Ogawara, J. y Ogawa, T. 1973. Patente japonesa. *Chem. Abstr.* **78**, 158.938.

Minoda, T. y Niioda, H. 1970. Patente japonesa 4.044; *Chem. Abstr.* **72**, 121.016.

Mirvish, S. S., Wallcave, L., Eagen, M. y Shubik, P. 1972. Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science.* **177**, 65.

Mizrahi, S., Labuza, T. P. y Karel. M. 1970. Computer-aider predictions of extent of browning in dehydrated cabbage. *J. Food Sci.* **35**, 799.

Montes, A. L. 1966. *Bromatología*. Editorial Eudeba, Buenos Aires.

Morad, M. M., Brannen, A. L. y Brekke, C. J. Antimicrobial activity of butylated hidroxyanisole and potassium sorbate against natural microflora in raw turkey meat and *Salmonella thyphimurium* in cooked turkey meat. *J. Food Prot.* **45**, 1038.

Nakamura, H. y Nakajima, T. 1970. Patente Japonesa 16.445. *Chem. Abstr.* **73**, 87.446.

Namiki, H. y Kada, T. 1975. Formation of ethylnitrolic acid by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Agric. Biol. Chem.* **39**, 1335.

Namiki, M., Udaka, S., Osawa, Tsuji, K. y Kada, T. 1980. Formation of mutagen by sorbic acid - nitrite reaction: effect of reaction conditions on biological activities. *Mutat. Res.* **73**, 21.

Namiki, H., Osawa, T., Ishibashi, H., Namiki, K. y Tsuji, K. 1981. Chemicals aspects of mutagen formation by sorbic acid - sodium nitrite reaction. *J. Agric. and Food Chem.* **29**, 407.

Namiki, M., Osawa, T., Kada, T., Tsuju, K. y Namiki, K. 1983. Formation of C-nitro and C-nitroso mutagens by the reaction of nitrite with sorbic acid and its analogues and their inactivation with foods constituents. *Carcinogens Mutagens Envirom.* 3, 109.

Nawar, W. W. 1978. Reaction mechanism in the radiolysis of fat. A review. *J. Agric. Food Chem.* 21, 21.

Newberne, P. M. 1979. Nitrite promotes lymphoma in rats. *Science.* 204, 1080.

Noeltner, G., Oehme, H., Lademann, R. y Wendt, F. 1980. Patente europea 4.049. *Chem. Abstr.* 92, 25.012.

Norrish, R. S. 1966. An equation for the activity coefficient and relative humidities of water in confectionery syrup. *J. Food Technol.* 1, 25.

Obanu, Z. A., Ledward, D. A. y Lawrie, R. A. 1977. Reactivity of glycerol in intermediate moisture meats. *Meat Sci.* 1, 177.

Obanu, Z. A. y Ledward, D. A. 1986. Reactivity of sorbate and glycerol in some model intermediate moisture systems. *Food Chem.* 21, 57.

Osawa, T. y Namiki, K. 1982. Mutagen formation in the nitrite piperic reaction. *Agric. Biol. Chem.* 46, 3105.

Osawa, T., Ishibashi, H., Namiki, M., Kada, T. y Tsuji, K. 1986. Desmutagenic action of food components on mutagens formed by the sorbic acid/nitrite reaction. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1971.

Osawa, T. y Namiki, K. 1982. Mutagen formation in the reaction of nitrite with the food components analogous to sorbic acid. *Agric. Biol. Chem.* 46, 2299.

Paquette, M. W., Robach, M. C., Sofos, J. N. y Busta, F. F. 1980. Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on color and sensory qualities of commercially prepared bacon. *J. Food Sci.* 45, 1293.

Park, G. L. y Nelson, D. B. 1981. HPLC analysis of sorbic acid in citrus fruit. *J. Food Sci.* 46, 1629.

- Park, H. S., Marth, E. H. y Olson, N. F. 1970. Survival of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. *J Milk Food Technol.* **35**, 532.
- Pederson, M., Albury, N. y Christiansen, M. D. 1961. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. IV. Fungistatic effects of organic acids. *Appl. Microbiol.* **9**, 162.
- Pekkarinen, L. 1964. Quantitative determination of sorbic acid in food by the thiobarbituric acid method. *Z. Anal. Chem.* **4**, 423.
- Pekkarinen, L. y Soimakallio, A. 1968. The effect of methanol and ethanol on the oxidation of sorbic acid by molecular oxygen in aqueous sulphuric acid solutions. *Suomen Kemistilehti B.* **41**, 277.
- Pekkarinen, L. 1969, a. The mechanism of oxidation of sorbic acid by molecular oxygen in water. *Suomen Kemistilehti.* **42**, 147.
- Pekkarinen, L. 1969, b. Autoxidation of sorbic acid in aqueous, citric acid-containing solution. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* **139**, 23.
- Pekkarinen, L. 1972. Influence of metal acetates on the oxidation of sorbic acid by molecular oxygen in acetic acid and comparison of the results with those of eleostearic acids. *Acta Chem. Scand.* **26**, 2367.
- Pekkarinen, L. 1975. The ferric salt catalyzed oxidation of sorbic acid. *Finn. Chem. Lett.* **6**, 157.
- Perry, J. H. 1963. Reaction kinetics reactor design and thermodynamics. En: *Chemical Engineers Handbook*. Mc Graw Hill Book Company, Nueva York.
- Pethybridge, A. D., Ison, R. W. y Harrigan, W. F. 1983. Dissociation constant of sorbic acid in water and water-glycerol mixtures at 25 °C from conductance measurements. *J. Food Technol.* **18**, 789.
- Petriella, C. 1986. Efecto de diversos humectantes en la cinética de pardeamiento no enzimático en soluciones de glucosa y lisina de alta actividad de agua. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Pierson, M. D., Ivey, F. J., Smoot, L. A. y Van Tassell, K. R. 1979. Potassium sorbate inhibition of *Clostridium botulinum* in bacon. *Anales 79° Annual Meet. Am. Soc. Microbiol.*, Los Angeles.

Pierson, M. D., Rice, K. M. y Robach, M. C. 1980. Influence of nitrite, sorbate and temperature on *Clostridium botulinum* growth. *Anales 80° Annual Meet. Am. Soc. Microbiol.*, Miami.

Pierson, M. D. y Smoot, L. 1982. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *Critical Rev. Food Sci. and Nutr.* 17, 141.

Pitzer, K. S. y Mayorga, G. 1973. Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *J. Phys. Chem.* 77, 2300.

Pitzer, K. S. 1973. Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equation. *J. Phys. Chem.* 77, 268.

Pokorny, J. 1980. Effect of browning reactions on the formation of flavor substances. *Die Nahrung.* 24, 115.

Powrie, W. D., Wu, C. H., Rosin, M. P. y Stich, H. F. 1981. Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems. *J. Food Sci.* 46, 1433.

Price, J. F. y Stevenson, K. E. 1979. Effects of sorbate and nitrite in bacon on color, flavor and *Clostridium botulinum* toxigenesis. *Anales 39° Annual Meeting Inst. Food Technologists.*

Raduchev, S. y Rizvanov, K. 1963. Sorbic acid as a carbon source of various microorganisms. *Chem. Abstr.* 59, 12.081.

Rehm, H. J., Wallnofer, P. y Lukas, E. M. 1964. The decomposition of sorbic acid in natural substrates by microorganisms. *Chem. Abstr.* 60, 1036.

Resnik, S. L. y Chirife, J. 1979. Effect of moisture content and temperature on some aspects of non-enzymatic browning in dehydrated apple. *J. Food Sci.* 44, 601.

Resnik, S. L., Favetto, G., Chirife, J. y Ferro Fontán, C. 1984. A world survey of water activity values of certain saturated solutions at 25°C. *J. Food Sci.* 49, 510.

Restaino, L., Komatsu, K.K. y Syracuse, M. 1982. Effects of acids on potassium sorbate inhibition of food related microorganism in culture media. *J. Food Sci.* 47, 134.

Restaino, L., Lenovich, L. M. y Bills, S. 1982. Effects of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food Prot.* **45**, 1138.

Reynolds, T. M. 1963. Chemistry of nonenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines. *Adv.in Food Research.* **12**, 1.

Robach, M. C. y Ivey, F. J. 1978. Antimicrobial efficacy of potassium sorbate dip on freshly processed poultry. *J. Food Prot.* **41**, 284.

Robach, M. C. 1979. Effect of processing variables on the outgrowth of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores in comminuted meat cured with sorbic acid and sodium nitrite. *Appl. Envirom. Microbiol.* **38**, 846.

Robach, M. C. 1980. Use of preservatives to control microorganisms in food. *Food Technology.* **Octubre**, 81.

Robach, M. C. y Stateler, C. L. 1980. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by potassium sorbate in combination with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole or ethylenediamine tetracetic acid. *J. Food Prot.* **43**, 208.

Robach, M. C., Owens, J. L., Paquette, M. W., Sofos, J. N. y Busta, F. F. 1980. Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on nitrosamine formation in commercially prepared bacon. *J. Food Sci.* **45**, 1280.

Robach, M. C., To, E. C., Meydav, S. y Cook, C. F. 1980. Effect of sorbates on microbiological growth in cooked turkey products. *J. Food Sci.* **45**, 638.

Roberts, T. A. y Smart, J. L. 1974. Inhibition of spores of *Clostridium spp.* in vacuum-packed bacon with particular reference to *C. perfringens (welchii)* and *C. botulinum*. *J. Food Technol.* **11**, 25.

Roberts, T. A. y Smart, J. L. 1976. The occurrence of clostridia, particularly *C. botulinum* in bacon and pork en: *Spore Research*. Ed. J. Wolf, A. N. Baker, D. J. Ellar, G. Dring, y G. W. Gould. Academic Press, Nueva York.

Roberts, T. A., Gibson, A. M. y Robinson, A. 1982. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats.III. The effect of potassium sorbate. *J. Food Technol.* **17**, 307.

Robinson, R. A. y Stokes, R. A. 1968. *Electrolyte solutions*. Butterworths Publication Ltd, Londres.

Roland, J. O. y Beuchat, L. R. 1984. Biomass and Patulin production by *Byssoschamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, sulphur dioxide and temperature. *J. Food Sci.* **49**, 402.

Roland, J. O., Beuchat, L. R., Worthington, R. E. y Hitchcock, H. L. 1984. Effect of sorbate, benzoate, sulphur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssoschamys nivea* in grape juice. *J. Food Prot.* **47**, 237.

Ross, D. V. 1975. Estimation of water activity in intermediate moisture foods. *Food Technol.* **29**, 26.

Roy, R. B., Sahn, M. y Conetta, A. 1976. Automated analysis of sorbic acid in food products. *J. Food Sci.* **41**, 372.

Rubin, A. A., Zitowitz, L. y Hansker, L. 1963. Acute circulatory effect of diazoxide and sodium nitrite. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **140**, 46.

Sado, I. 1974. Synergistic toxicity of officially permitted food preservatives. *Chem. Abstr.* **81**, 89947.

Sajur, S. 1985. Preconservación de duraznos por métodos combinados. Tesis M.S. Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Salo, T. 1963. Die Komarowski-Farbreaktion mit Sorbinsäure. *Suomen Kemistilehti, B.* **36**, 1.

Sato, K. 1980. Japanese patent 163.516. *Chem. Abstr.* **92**, 214.898.

Saunders, J. y Jervis, F. 1966. The role of buffer salts in non-enzymatic browning. *J. Sci. Food Agric.* **17**, 246.

Saxby, M. J., Stephens, M. A. y Reid, R. G. 1982. Degradation of sorbic acid in model food systems. *Food Chem.* **9**, 283.

Scatchard, G., Hamer, W. J. y Wood, S. E. 1938. Isotonic solutions. 1. The chemical potential of water in aqueous solutions of sodium chloride, potassium chloride, sulphuric acid, sucrose, urea and glycerol, at 25 °C. *J. Am. Soc.* **60**, 3061.

Scott, W. J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* 7, 83.

Segner, W. P., Schimdt, C. F. y Boltz, J. K. 1966. The interaction of selected chemical additives with low doses of irradiation against spores of *Clostridium botulinum* type E. *Anales 26^o Annual Meeting Inst. Food Technologists.*

Seow, C. C. y Cheah, P. B. 1985, a. Kinetics of degradation of sorbic acid in aqueous glycerol solutions. *Food. Chem.* 17, 95.

Seow, C. C y Cheah, P. B. 1985, b. Reactivity of sorbic acid and glycerol in nonenzymatic browning in liquid intermediate moisture model systems. *Food. Chem.* 18, 71.

Seward, R. A., Deibel, R. H. y Lindsay, R. C. 1982. Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores in microcultures. *Appl. Envirom. Microbiol.* 44, 1212.

Shahidi, F., Rubin, L. J., Diosady, L. L., Kassam, N. y Li Sui Fong, J. C. 1986. Effect of sequestering agents on lipid oxidation in cooked meats. *Food Chem.* 21, 145.

Shaw, P. E., Tatum, J. H. y Berry, R. E. 1967. Acid-catalyzed degradation of D-fructose. *Carbohydr. Res.* 5, 266.

Simic, G. 1983. *Preservation of Food by Ionizing Radiation.* Ed. E.S. Joshepson y M. S. Peterson. CRC. Press, Boca Ratón.

Smith, L. A., Simmons, S. L., McKeith, F. J., Bletchel, P. I. y Brady, P. L. 1984. A research note. Effects of sodium tripolyphosphate on physical and sensory properties of beef and pork roasts. *J. Food Sci.* 49, 1636.

Smittle, R. B. y Flowers, R. S. 1982. Acid-tolerant microorganisms involved in spoilage of salad dressings. *J. Food Prot.* 45, 977.

Smoot, L. A. y Pierson, M. D. 1981. Mechanisms of sorbate inhibition of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spore germination. *Appl. Envirom. Microbiol.* 42, 477.

Smyth, H. F. y Carpenter, C. P. 1948. Further experience with the range finding test in the industrial toxicology laboratory. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 30, 63.

- Sofos, J. N., Busta, F. F. y Allen, C. E. 1979. Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats: a review. *J. Food Prot.* **42**, 739.
- Sofos, J. N., Busta, F. F., Bhothipaksa, K., Allen, C. E., Robach, M. C. y Paquette, M. W. 1980. Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on *Clostridium botulinum* toxin production in commercially prepared bacon. *J. Food Sci.* **45**, 1285.
- Sofos, J. N. y Busta, F. F. 1980. Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. *J. Food Technol.* **34**, 244.
- Sofos, J. N. y Busta, F. F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Prot.* **44**, 614.
- Sofos, J. N. y Busta, F. F. Sorbates. 1983. En: *Antimicrobials in Foods*. Ed. A.L Brannen y P. M. Davidson. Marcel Dekker, Nueva York.
- Sofos, J. N. 1989. *Sorbate Food Preservatives*. Academic Press, Florida.
- Sokal, R. R. y Rohlf, J. B. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Song, P. S., Chichester, C. O. y Stadtman, F. H. 1966. Kinetic behavior and mechanism of inhibition in the Maillard reaction. I. Kinetic behavior of the reaction between d-glucose and glycine. *J. Food Sci.* **31**, 906.
- Sperber, W. 1983. Influence of water activity on food-borne bacteria. Review. *J. Food Prot.* **46**, 142.
- Spiridinov, V. P. y Lopatkin, A. A. 1973. *Tratamiento Matemático de Datos Fisico-Químicos*. Mir, Moscú.
- Stafford, A. E. 1976. Rapid analysis of potassium sorbate in dried prunes by ultraviolet or colorimetric procedures. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 894.
- Stafford, A. E. y Black, D. R. 1978. Analysis of sorbic acid in dried prunes by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1442.
- Stamp, J. A. y Labuza. 1983. Kinetics of the maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperature. *J. Food Sci.* **48**, 543.

Steel, R. G. y Torrie, J. H. 1960. *Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to Biological Sciences*. McGraw Hill, Nueva York.

Steinbach, K. J. y Franzke, C. 1963. Effect of antioxidants and sorbic acid on antioxidation. *Chem. Abstr.* **59**, 4479.

Suyama, K. y Adachi, S. 1979. Browning reaction between phospholipids and acetaldehyde. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1981.

Svorcova, L. 1980. Effect of ascorbic acid, potassium sorbate and the pH on nonsporulating bacteria in nonalcoholic beverages. *Chem. Abstr.* **92**, 4825.

Takano, M. y Nakajima, M. 1977. Patente alemana 2.625.668; *Chem. Abstr.* **87**, 166.345.

Tannenbaum, S. R. 1976. Relative risk of nitrite ingestion. En *Anales Meat Ind. Res. Conf. American Meat Institute, Chicago*, **3**, 25.

Tannenbaum, S. R., Fett, D. Young, V. R. Land, P. D. y Bruce, W. R. 1978. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine, *Science.* **200**, 1487.

Tannenbaum, S. R. 1982. Modificaciones químicas y bioquímicas de los alimentos y su influencia sobre la calidad. En: *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. Ed. O. R. Fennema. Editorial Reverté, Buenos Aires.

Terada, H., Hisada, K., Asanoma, M., Maruyama, Y., Ishihara, T. y Sakabe, Y. 1979. Studies on the analysis of food additives by high performance liquid chromatography. I Rapid determination of sorbate, dehydroacetate and benzoate in foods. *Chem Abstr.* **90**, 85.370.

Thakur, B. R., Trehan, I. R. y Arya, S. S. 1990. Radiolytic degradation of sorbic acid in isolated systems. *J. Food Sci.* **55**, 1699.

Thakur, B. R. y Arya, S. S. 1991. Role of sorbic acid in non-enzymatic browning in liquid and solid model food systems. *International J. of Food Sci. and Technol.* **26**, 157.

Troller, J. A. y Christian, J. H. B. 1978. *Water Activity and Food*. Academic Press, Nueva York.

U.S. Department of Agriculture. 1978. Regulations: 43, 21.007; 36.697.

Uematsu, E., Okada, T. y Yamada, N. 1970. Japanese patent 24.579; *Chem. Abstr.* 72, 31.237.

Urbain, W. M. 1878. Food irradiation. *Adv. Food Res.* 24, 155.

Vidyasagar, K. y Arya, S. S. 1983. Stability of sorbic acid in orange squash. *J Agric. Food Chem.* 31, 1262.

Vidyasagar, K. y Arya, S. S. 1984. Degradation of sorbic acid in fruit squashes and fish paste. *J. Food Technol.* 19, 447.

Wagner, M. K. y Busta, F. F. 1983. Effect of sodium pyrophosphate in combination with sodium nitrite or sodium nitrite/potassium sorbate on *Clostridium botulinum* growth and toxin and toxin production in beef/pork frankfurter emulsion. *J. Food Sci.* 48, 990.

Warmbier, H. C., Schnickels y Labuza, R. A. 1976. Effect of glycerol and nonenzymatic browning in a solid intermediate moisture model food system. *J. Food Sci.* 41, 528.

Wasserman, A. E. y Talley, F. 1972. The effect of sodium nitrite on the flavor of frankfurters. *J. Food Sci.* 37, 536.

Watts, B. M. 1950. Phosphates as synergistic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 27, 48.

Webster, C. E. M., Allison, S. E., Adelakun, I. O., Obanu, Z. A. y Ledward, D. A. 1986. Reactivity of sorbate and glycerol in intermediate moisture meat products. *Food Chem.* 21, 133.

Wedzicha, B. L. 1984. *Chemistry of Sulphur dioxide in Foods*. Elsevier Applied Science Publishers, Londres.

Wedzicha, B. L. y Brook, M. A. 1989. Reaction of sorbic acid with nucleophiles: preliminary studies. *Food Chem.* 31, 29.

Wedzicha, B. L. y Zeb, A. 1990. Catalysis of the reaction between sorbic acid and thiols by surfactants. *Int. J. Food Sci Technol*, 25, 168.

Wedzicha, B. L. y Zeb, A. 1991. Catalysis of the sorbic acid - thiol reaction by bovine serum albumin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **26**, 381.

Werner, H. y Jensen, F. 1981. Determination of low levels of sorbic acid in cheese. *Chem Abstr.* **94**, 63.880.

Wiener Lab. 1994. Enzymatic test for glucose in blood by Trinder. Rosario.

Willamowski, G. 1971. Collaborative study of the colorimetric determination of sorbic acid in cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **54**, 663.

Willamowski, G. 1974. Collaborative study of the spectrophotometric method for the determination of sorbic acid in fresh dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**, 675.

Willemot, C. and Fillion-Delorme, N. 1986. Stimulation of polyunsaturated fatty acid breakdown by nitrite during cooking of pork. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* **19**, 254.

Wuerdig, G. 1985. Technology of sorbic acid treatment. *J. Food Prot.* **48**, 525.

Yousef, A. E. y Marth, E. H. 1983. Incorporation of [¹⁴C] acetate by *Aspergillus parasiticus* in presence of antifungal agents. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 103.

Zamora, M. C. y Zaritzky, N. E. 1987, a. Potassium sorbate inhibition of microorganisms growing on refrigerated packaged beef. *J. Food Sci.* **52**, 257.

Zamora, M. C. y Zaritzky, N. E. 1987, b. Antimicrobial activity of undissociate sorbic acid in vacuum packaged beef. *J. Food Sci.* **52**, 1449.

Zipser, M. W. y Watts, B. M. 1962. A modified 2-thiobarbituric acid method for the determination of malonaldehyde in cured meats. *Food Technol.* **16**, 102.

Zygmunt, L. C. 1979. Gas-liquid chromatographic determination of sorbic acid and sodium benzoate in table syrup. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **62**, 939.