

Tesis de Posgrado

Reacciones entre sorbatos y nitritos en sistemas cárnicos

Binstok, Guillermo Francisco

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos 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:

Binstok, Guillermo Francisco. (1998). Reacciones entre sorbatos y nitritos en sistemas cárnicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3165_Binstok.pdf

Cita tipo Chicago:

Binstok, Guillermo Francisco. "Reacciones entre sorbatos y nitritos en sistemas cárnicos". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3165_Binstok.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FCE y N BIBLIOTECA

**Reacciones entre sorbatos y nitritos
en sistemas cárnicos**

Guillermo Francisco Binstok

*Tesis presentada para optar al Título de
Magister de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Bromatología y Tecnología de la
Industrialización de Alimentos*

Dirección: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Codirección: Dra. Carmen Adriana Campos

1998

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Reacciones entre sorbatos y nitritos en sistemas cárnicos

Guillermo Francisco Binstok

*Tesis presentada para optar al Título de
Magister de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Bromatología y Tecnología de la
Industrialización de los Alimentos.*

Dirección : Dra. Lía Noemí Gerschenson

Codirección : Dra. Carmen Adriana Campos

1998

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires, a la Secretaría de Ciencia y Técnica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por el apoyo financiero recibido para la realización del presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y, en particular, al Departamento de Industrias, por la formación recibida y por facilitar el uso de sus instalaciones.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, directora de este trabajo, por toda la dedicación brindada en estos años y su respaldo en los momentos más difíciles.

A la Dra. Carmen Adriana Campos, codirectora del mismo, por su dedicación, cariño, ayuda y, por sobre todo, su infinita paciencia.

Al Dr. Oscar Varela, por el inestimable asesoramiento científico recibido, su desinteresada ayuda y su afecto.

A mis queridos amigos Mariano Castro, Andrea Nieto y Hernán Orgueira, compañeros y testigos durante más de diez años de alegrías y sinsabores.

A mis compañeros de trabajo y amigos del Departamento de Industrias : Dra. Stella Maris Alzamora, Ing. Pablo Bonelli, Dra. Pilar Buera, Dra. Sandra Guerrero, Lic. Mónica Haros, Lic. Gabriel Horowitz, Dra. Ana Pilosoff, Dra. Lucía Pollio, Dra. Ana Rojas, Dr. Constantino Suárez, Dra. Marcela Tolaba, Dra. Susana Vidales, Ing. Pascual Viollaz; por el afecto y la ayuda que me brindaron a lo largo de estos años. Hago extensivo este reconocimiento a mis compañeros del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales : Lic. Cristián Di Nardo, Dr. Alejandro Nin, Lic. Hernán Schultz, Dra. Susana Vigo, Dra. Patricia Zunszain.

A la Lic. Mariela Carnino y la Dra. Graciela Cerella, por la inestimable asistencia técnica recibida en algunas etapas de este trabajo y su trato personal.

A mi madre, a mi hija y a la memoria de mi padre.

Guillermo Francisco Binstok

*No siempre puedes conseguir lo que quieres
pero si alguna vez lo intentas
podrás encontrar y conseguir lo que necesitas*

M. Jagger - K. Richards

1969

INDICE

	Página
CAPITULO PRIMERO. INTRODUCCION.	6
1) Conservación de alimentos.	6
a) Calidad alimentaria.	
b) Actividad de agua.	
c) Métodos combinados.	
2) Productos cárnicos.	9
a) Conservación de productos cárnicos.	
b) Ingredientes del curado.	
c) Embutidos.	
d) Conservas.	
e) Otros productos cárnicos.	
3) Nitritos.	13
a) Reseña histórica.	
b) Uso del nitrito.	
c) Propiedades antimicrobianas.	
d) Toxicidad.	
e) Posibles sustituyentes.	
4) Acido sórbico.	21
a) Características y obtención.	
b) Acción antimicrobiana.	
c) Toxicidad y metabolismo.	
d) Reactividad.	
5) Uso combinado de sorbatos y nitritos.	31
a) Carnes curadas.	
b) Productos de reacción sorbato - nitrito.	
c) Acción de reductores sobre la reacción sorbato - nitrito.	
d) Migración de sorbatos en tripas de embutidos.	
e) Legislación actual sobre el tema.	

6) Objetivos del trabajo propuesto y relevancia del mismo.	38
7) Antecedentes.	38
8) Etapas del trabajo realizado.	38
CAPITULO SEGUNDO. MATERIALES Y METODOS.	40
Primera parte. Síntesis de patrones puros de ácido etilnitroso (ENA) y 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y).	42
Segunda Parte. Análisis de la formación de ENA e Y en sistemas modelo acuosos y en homogenatos cárnicos.	46
Tercera Parte. Análisis cuantitativo de ENA en sistemas cárnicos.	57
Cuarta Parte. Análisis cuantitativo de sorbato de potasio en productos cárnicos comerciales argentinos.	59
CAPITULO TERCERO. RESULTADOS.	64
Primera parte. Caracterización del 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y) y del ácido etilnitroso (ENA) obtenidos por síntesis.	65
Segunda Parte. Análisis de la presencia de ENA e Y en sistemas modelo acuosos y en homogenatos cárnicos.	74
Tercera Parte. Análisis cuantitativo de ENA en sistemas cárnicos.	75
Cuarta Parte. Análisis cuantitativo de sorbato de potasio en productos cárnicos comerciales argentinos.	78
CAPITULO CUARTO. DISCUSION.	79
BIBLIOGRAFIA.	86

Capítulo Primero

INTRODUCCION

1) PRESERVACION DE ALIMENTOS.

a) Calidad alimentaria.

Para mantener un alto nivel de salud nutricional se requiere la provisión al ser humano de un alimento sano y nutritivo, el cual le aporte todos los nutrientes esenciales para satisfacer sus necesidades.

Actualmente los consumidores utilizan ampliamente alimentos preservados (sujetos a tratamientos fisicoquímicos para aumentar su vida útil y segura). Ello ha incrementado la importancia del desarrollo de técnicas de preservación que aseguren la alta calidad de dichos productos. Para definir la calidad de un alimento se deben tomar en cuenta tres aspectos : el *higiénico - sanitario*, ya que el alimento debe ser inocuo; el *nutritivo*, relacionado a la presencia de nutrientes y antinutrientes en el mismo y la *aceptabilidad* del producto, la cual está vinculada a las características organolépticas y la percepción psicosensorial (Tannenbaum, 1982).

Los tratamientos de preservación actualmente en uso son los tradicionales (congelación, deshidratación, esterilización comercial) así como las técnicas que combinan diversos factores de stress microbiano (tratamiento térmico suave, control de pH, disminución del contenido de agua y agregado de preservadores permitidos).

b) Actividad de agua.

Desde un punto de vista cuantitativo, el agua es el componente principal de la mayoría de los alimentos y cumple un papel esencial en lo que hace a la estructura y demás caracteres de los productos vegetales y animales. Por otra parte, las propiedades del agua en los alimentos y su relación con el resto de los componentes son responsables de su aptitud para el deterioro (Cheftel y Cheftel, 1976). Varios métodos de preservación se fundamentan total o parcialmente en el descenso de la disponibilidad de agua.

La disminución en la disponibilidad de agua puede producirse de varias formas : por evaporación (en cuyo caso el proceso implica secado o concentración), por sublimación (liofilización), por transformación de agua en hielo y su consecuente inmovilización (congelación) o por aumento en la concentración de solutos (salado o curado). La mejor expresión para definir la disponibilidad de agua para la proliferación microbológica u otras

reacciones químicas en el alimento es el concepto de *actividad de agua* (a_w).

La actividad de agua 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 la cual $a_w = 1$ (Lewis y Randall, 1961). Eligiendo como estado estándar el agua pura a presión atmosférica, la actividad de agua de una solución es :

$$a_w = f / f_0$$

donde f_0 es la fugacidad del agua pura.

En alimentos, y bajo las condiciones en que son procesados, almacenados y consumidos, la diferencia entre fugacidad y presión de vapor es despreciable por lo cual la a_w puede definirse como :

$$a_w = p / p_0$$

donde p es la presión de vapor de agua en la solución y p_0 la presión de vapor del agua pura.

El valor mínimo de a_w por debajo del cual un microorganismo no puede proliferar se denomina a_w *mínima*. Este valor depende de los restantes factores que condicionan la vida celular (pH, disponibilidad de nutrientes, presión de oxígeno, temperatura, etc).

La deshidratación osmótica sufrida por un microorganismo en un medio de actividad acuosa disminuida es directamente proporcional a la diferencia entre la actividad acuosa intra y extracelular. El metabolismo celular se dirige entonces a igualar las presiones de vapor de agua a ambos lados de la membrana plasmática, lo cual genera una gran demanda de energía que no puede ser empleada para crecimiento y síntesis de nuevas células. Al alcanzar el medio externo la a_w *mínima*, el gasto energético es tal que el crecimiento se inhibe.

c) Métodos combinados.

La vida cotidiana en las grandes ciudades plantea cada día con mayor exigencia la necesidad de desarrollar alimentos de alta calidad nutricional y organoléptica, lo que provoca un aumento en la demanda de métodos de preservación que permitan alcanzar este objetivo. Los alimentos *congelados* han experimentado una gran expansión en el mercado, sin embargo requieren de un estricto mantenimiento de la cadena de frío (lo cual incrementa considerablemente los costos). Por otra parte, los alimentos *deshidratados* sufren daños en su textura y reacciones de deterioro durante su procesamiento como pardeamiento no enzimático, oxidación de lípidos y pérdida de vitaminas. Con respecto a los alimentos *esterilizados*, las condiciones de abuso térmico a que son sometidos generan severas pérdidas en sus propiedades sensoriales y en su valor nutritivo. Los alimentos preservados por *irradiación* tampoco han logrado afianzarse : sus costos y cierta intrínseca desconfianza por

parte del consumidor hacia esta tecnología no favorecen su inserción en el mercado.

Ante este panorama, en los últimos años, se ha experimentado un notable desarrollo de los *alimentos de humedad intermedia* (cuyos valores de a_w oscilan entre 0,75 y 0,80). La reducción en la actividad de agua se realiza mediante el agregado de solutos, que por esta causa son llamados humectantes (Leistner y Rödel, 1975; Leistner y Rödel, 1976; Aguilera y Parada Arias, 1992). Esta técnica de preservación se ha aplicado durante siglos pero sólo en las últimas décadas se ha establecido un marco teórico dentro del cual desarrollarlas (Ferro Fontán y col., 1979; Chirifé y col., 1980; Chirifé y Ferro Fontán, 1980). El mayor inconveniente que presenta este método son los cambios organolépticos que implica el agregado de solutos y aditivos que, por otra parte, pueden actuar como sustratos en reacciones de deterioro como oxidaciones o pardeamientos. Estas desventajas han disminuido las oportunidades de estos productos de afianzarse en el mercado (Troller y Cristian, 1978).

En vista de los problemas ya mencionados, la investigación en preservación se orientó hacia el desarrollo de alimentos de alta actividad de agua (con a_w de 0,90 – 0,95) llamados *alimentos de alta humedad* (Sperber, 1983), logrando la estabilidad microbiológica mediante una combinación de factores (“obstáculos”) que detienen el crecimiento microbiano (Leistner, 1992; Leistner, 1994, a y b). El nombre que recibe esta metodología es *preservación por métodos combinados*. El concepto de “obstáculo” implica que la barrera al crecimiento microbiano se obtiene mediante la combinación de factores tales que ninguno de ellos sería letal si fuera usado individualmente en la misma forma. La combinación genera complejas interacciones que incrementan la demanda de energía o reducen su disponibilidad para el crecimiento. Estos alimentos resultan ser, por otra parte, aceptables organolépticamente pues la combinación de factores detiene no sólo la proliferación microbiológica sino también las reacciones químicas de deterioro durante un tiempo suficiente para que el alimento sea comercializado (Leistner y col., 1981; Leistner, 1987). Entre los “obstáculos” más comúnmente utilizados se encuentran los siguientes (Gould y col., 1983) :

Factores que reducen la disponibilidad de energía :

- Exclusión de oxígeno.
- Limitación de nutrientes.
- Reducción de la temperatura.

Factores que incrementan la demanda de energía :

- Reducción de la actividad de agua.
- Reducción del pH.
- Adición de ácidos lipofílicos con acción antimicrobiana.

Entre los ácidos lipofílicos con acción antimicrobiana más comúnmente utilizados se encuentra el *ácido sórbico*, cuya reactividad frente al uso combinado con nitrito en productos cárnicos curados es el tema central de este trabajo.

Otro elemento que suele emplearse junto con los anteriores es la aplicación de un tratamiento térmico suave de forma tal de generar un daño sub - letal a los microorganismos y debilitarlos frente a los demás factores. En suma, existen hoy en día más de 50 “obstáculos” de potencial uso en alimentos asociados a los ya descritos (Leistner, 1994, b; Bøgh - Sorensen, 1994).

2) PRODUCTOS CARNICOS.

a) Preservación de productos cárnicos.

Los procesos usados en la preservación de carnes pretenden evitar su alteración microbiana sin afectar a la calidad organoléptica. La carne figura dentro del grupo de alimentos más perecederos, por lo tanto las medidas de preservación han de aplicarse inmediatamente después del sacrificio. Los métodos de conservación, aunque aparentemente difieren entre sí, se parecen en que utilizan las condiciones ambientales para impedir el crecimiento microbiano y pueden clasificarse en métodos basados en el *control de la temperatura* (refrigeración, congelación), métodos basados en un *tratamiento térmico* (pasteurización, escaldado, esterilización), *inhibición directa de microorganismos* (irradiación, ahumado, uso de antibióticos y / o conservadores) y métodos basados en el *control de humedad* (deshidratación, liofilización y curado). A medida que aumentan los conocimientos sobre estos temas, el control de estos factores es cada día más específico y deliberado, aunque ya era notablemente eficaz cuando se basaba en la observación empírica (Lawrie, 1977).

Desde un punto de vista histórico, el *salado* de la carne se puede definir como el proceso de añadir sal a la carne con el propósito de conservarla. Esta tecnología es una de las primeras herramientas desarrolladas por el ser humano en la búsqueda de métodos eficaces y seguros de preservación de alimentos. La eficacia del proceso se debe principalmente a que la elevada presión osmótica generada por este producto inhibe el crecimiento microbiano. El término *curado* de la carne significa la adición de sal, azúcar y nitratos y / o nitritos. El advenimiento de la refrigeración comercial y la heladera hogareña disminuyó en gran medida la necesidad de preservar la carne por medio del curado y otros factores como el color, el flavor y el rendimiento resultan hoy ser los más importantes. Con estos fines, en el curado de la carne se emplea toda una variedad de productos como especias, ascorbato, fosfatos, bicarbonato sódico (para ajustar pH), emulsificantes, etc. (Townsend y Olson, 1994).

Las técnicas de curado utilizadas son tres, a saber :

Curado en seco o salazón : se recubre la superficie de las piezas con la sal curante; la penetración de los ingredientes es favorecida por los cambios en la presión osmótica provocados por la sal. Este método es lento, genera encogimiento de la carne (con su consecuente merma en el rendimiento) y facilita reacciones de enranciamiento. Debido a estas desventajas, sólo es utilizado en forma artesanal y suele ser combinado con otros métodos de

preservación (cocción, ahumado).

Curado en húmedo : se sumerge la carne en una salmuera conteniendo las sustancias curantes, generándose una distribución uniforme y una reducción del tiempo de curado.

Curado por inyección : este método consiste en introducir la salmuera en el interior de la carne por medio de la inyección a presión y complementar el curado con el sistema húmedo o el seco. De esta forma, se asegura una óptima distribución de las sustancias curantes en la carne, además de reducir el tiempo de proceso (Paltrinieri y Meyer, 1990).

b) Ingredientes del curado.

Son sustancias que causan alteraciones positivas en la carne, como el mejoramiento del poder de conservación, el aroma, color, sabor y consistencia. Además sirven para obtener un mayor rendimiento en peso debido a su capacidad fijadora del agua.

Sal común : la finalidad de su agregado es prolongar el poder de conservación (reduciendo el valor de la a_w), mejorar el sabor y la coloración, fijar agua (gracias a la acción de proteínas miofibrilares solubles en soluciones salinas) y favorecer la emulsificación de ingredientes y la acción de las otras sustancias curantes. Resulta de suma importancia la composición de la sal pues impurezas de cromo, hierro y cobre generan (aún en nivel de trazas) una marcada tendencia hacia el enranciamiento oxidativo. El efecto fijador de agua se incrementa con la concentración de sal, por lo tanto con la misma se incrementa el rendimiento. El límite de la adición es fijada por razones de sabor (Frey, 1995).

Azúcar y edulcorantes : actúan sobre el sabor y ayudan a encubrir el tenor salado. La importancia del azúcar como saborizante ha disminuido en las últimas décadas debido a la evolución experimentada desde un producto original fuertemente salado hasta el actual, suavemente curado. Por otra parte, se ha comprobado que los azúcares contribuyen a ablandar el producto (pues prevendrían la pérdida de humedad) y sirven como donantes de energía para microorganismos presentes en algunos embutidos, los cuales desdoblan dichos azúcares a ácidos, descendiendo el pH del producto lo cual contribuye a la estabilidad (Frey, 1995).

Nitratos y nitritos : son generadores del enrojecimiento característico de estos productos, contribuyen al flavor y cumplen una función bactericida que los hace irremplazables. Sus propiedades y usos será tratados en el próximo ítem.

Fosfatos : su función principal es aumentar la capacidad de retención de agua con el fin de reducir la merma por conservación y, de esta forma, aumentar el rendimiento. La capacidad de los fosfatos para solubilizar proteínas musculares y aumentar el pH de la carne le permite cumplir con este propósito. Sólo los fosfatos alcalinos son eficaces pues los ácidos reducen el pH y aumentan la contracción del tejido. La retención de agua genera varios beneficios secundarios en el aspecto organoléptico : mejora el sabor, reduce la posibilidad que ocurra enranciamiento oxidativo, favorece la retención de color y disminuye el sabor a cocido

(Townsend y Olson, 1994).

Acido ascórbico : sus principales funciones son contribuir al desarrollo del color (impidiendo la oxidación de la nitrosomioglobina) y disminuir el tenor de nitrosaminas formadas por reacción entre nitrito y aminas presentes en el tejido. Este punto será discutido más adelante.

Saborizantes y especias : originalmente se agregaban en la superficie pero con el advenimiento de la tecnología de la inyección de salmuera pueden ser introducidos directamente en el interior de la carne. Los saborizantes más comunes son pimienta, vinagre, clavo, ajo, jengibre, romero, nuez moscada, anís y canela. Las especias pueden agregarse enteras, molidas o como aceites esenciales. La intensidad del sabor puede aumentarse con el uso de potenciadores como proteínas hidrolizadas vegetales (HVP) o glutamato monosódico (MSG).

Agentes ligantes y de relleno : son productos no cárnicos que se incorporan para favorecer la estabilidad física de la emulsión (ligando agua y grasa), aumentar el rendimiento en el tratamiento térmico, mejorar el sabor y reducir costos de formulación. Su uso se limita al 3.5 % con excepción de la proteína de soja (2 %). Entre los productos más utilizados figuran los derivados lácteos (caseinatos, lactosuero), almidones, proteínas de soja (aislados, concentrados o harina) y gelatinas.

c) Embutidos.

La carne es comercializada en forma fresca o elaborada en forma de una gran variedad de productos cárnicos. Los *embutidos* son productos de salchichonería elaborados con carne vacuna o de cerdo, grasa, sangre, vísceras, despojos, condimentos y aditivos. El objetivo de la elaboración de estos productos es mejorar la conservación, desarrollar sabores diferentes y elaborar partes del animal que son difíciles de comercializar en forma fresca.

La elaboración de embutidos comenzó con el simple proceso de salado y secado de la carne con el fin de conservar la carne que no se consumía en forma inmediata. En los siglos siguientes, la tecnología del curado se desarrolló hacia el agregado de sales, especias y otros condimentos. Muchos de los productos conocidos hoy en día deben sus nombres a sus lugares de procedencia, en su mayor parte ciudades de Europa. Los embutidos cocidos proceden del norte del continente, donde el clima era lo suficientemente frío como para permitir su conservación y almacenamiento. Los embutidos secos, por otra parte, provienen de la Europa meridional donde las temperaturas templadas requieren un descenso en la humedad para garantizar la estabilidad del producto (Rust, 1994).

Los embutidos constan de dos partes : el embutido propiamente dicho y una *tripa* que lo rodea. Los envases tradicionales son las tripas animales, obtenidas del tracto gastrointestinal de reses o cerdos. La estructura básica de estas tripas es el colágeno que tiene características casi únicas pues luego de sufrir procesos como ahumado y secado su estructura se vuelve

impermeable a la humedad. Por su parte, las tripas artificiales poseen características propias para cada tipo de embutido; así existen en el mercado tripas de celulosa, de colágeno o de materiales plásticos como polietileno o cloruro de polivinilo.

De acuerdo al tipo de las materias primas utilizadas, su forma de preparación y la tecnología de elaboración se distinguen tres clases de embutidos : crudos, escaldados y cocidos (Paltrinieri y Meyer, 1990).

Los embutidos *crudos* no pasan por un proceso de cocción en agua. Pueden consumirse en estado fresco o cocinado después de la maduración. Existen diversos tipos de embutidos crudos, que se diferencian por las sustancias curantes y condimentos agregados de acuerdo al sabor, aroma, color y consistencia deseados. Ejemplos de esta clase de productos son el chorizo, la longaniza y los distintos tipos de salame.

Los embutidos *escaldados* se elaboran a partir de carne fresca no completamente madurada y se someten a un proceso de escaldado antes de su comercialización, con el fin de disminuir el contenido de microorganismos, favorecer la conservación y coagular las proteínas para formar una masa consistente. Las salchichas son el tipo más común de embutidos escaldados.

Los embutidos *cocidos* se fabrican a partir de carne y grasa de cerdo, vísceras y sangre. Estas materias primas son sometidas a un tratamiento de calor antes de ser sazonadas, trituradas y embutidas. El embutido se cuece nuevamente y, ocasionalmente, se ahuma. Entre los embutidos cocidos más comunes figura el paté y la morcilla.

En cualquiera de los tres casos, la presencia de nitratos y nitritos en la sal de cura resulta esencial.

d) Conservas.

La conservación de la carne por tratamiento térmico data de los comienzos del siglo XIX en que Appert (1810), ignorando la naturaleza de los procesos correspondientes, descubrió que la carne se conservaba en estado comestible cuando se calentaba dentro de un recipiente hermético. Los productos cárnicos procesados pueden someterse a dos niveles térmicos : la *pasteurización*, que detiene parcialmente el crecimiento microbiano modificando al mínimo el producto tratado y la *esterilización*, en que se destruyen casi todas las bacterias, pero que modifica la carne en forma considerable. La mayor parte de las carnes enlatadas son comercialmente estériles; esto significa que se han sometido a un proceso capaz de destruir casi todos los microorganismos y esporas microbianos (Lawrie, 1977).

Los productos pasteurizados, como los jamones, son cocidos en agua caliente. Estos productos deben conservarse bajo refrigeración durante la fase de comercialización. La duración de la conservación depende del efecto bacteriostático del cloruro de sodio y del nitrato y nitrito presente. Estos productos no son procesados por esterilización para que puedan conservar sus características de color, aroma, aspecto y jugosidad.

La duración de los productos cárnicos esterilizados es de uno a ocho años a temperatura ambiente mientras que la de los productos pasteurizados es de uno a dos meses, a una temperatura de 4 °C (refrigeración).

e) Otros productos cárnicos.

Por sus características, la hamburguesa se constituye en uno de los mejores ejemplos e indicadores de los cambios acaecidos en las últimas décadas en la cultura alimentaria de la civilización occidental. No tiene desperdicios, es rápida de preparar y cocinar, barata y fácil de acompañar con condimentos y sabores varios. El Código Alimentario Argentino define a la hamburguesa o “bife a la hamburguesa” como un chacinado elaborado con carne picada con el agregado de sal, glutamato y ácido ascórbico. Su contenido de grasa no debe superar el 20 %, mientras que por su condición de chacinado no debe tener más de un 75 % de agua expresada sobre productos desgrasados. Sin embargo, reportes sobre el contenido de aditivos en hamburguesas mencionan la presencia de nitratos y nitritos; los niveles verificados estuvieron por debajo de 30 ppm en todos los casos analizados (Martínez, 1991). Si bien la función esencial del nitrito reside en impedir la proliferación bacteriana (especialmente *Cl. botulinum*), en un alimento como la hamburguesa cuya vida útil se calcula en seis días (a temperatura de refrigeración), dicho agregado carece de sentido. Por otra parte, niveles de 30 ppm de nitrito resultan insuficientes para cumplir dicho objetivo : se considera necesario agregar a chacinados entre 50 y 200 ppm. Los nitritos podrían ser empleados como resaltadores de color; con este fin la cantidad de 30 ppm también resulta insuficiente y además para ello ya se emplea el ácido ascórbico, resultando así su uso redundante, con la desventaja de otorgarle a la hamburguesa un tono rojizo después de la cocción.

La presencia de nitratos y nitritos en estos productos no deja de ser una realidad preocupante. Sin embargo, aún en aquellos productos cárnicos en los cuales su uso está permitido, el uso de nitrito no ha dejado de generar controversias debido a su toxicidad (Rubin y col., 1963; Emerick y col., 1963; Lijinsky y Epstein, 1970; Fazio y col., 1971; Tannenbaum, 1976; DiFate, 1977; USDA, Fed. Regist., 1978; Newberne, 1979).

3) NITRITOS.

a) Reseña histórica.

Los nitritos han sido agregados a carnes durante muchos siglos. Históricamente, el uso de sal para preservar carne o pescado puede remontarse a las antiguas civilizaciones egipcias y mesopotámicas. Es probable que el nitrito de sodio ya estuviera presente como impureza en la sal utilizada para estos primitivos procesos de preservación. Sin embargo, fueron los antiguos romanos quienes desarrollaron técnicas de preservación empleando sales conteniendo nitratos y nitritos con la intención de obtener un color y flavor diferente al obtenido con la sal común

(Binkerd y Kolari, 1975). Con el transcurrir de los siglos, la práctica del curado de carnes fue perfeccionándose y durante el siglo XIX fue considerada como un arte, cuyos secretos eran celosamente guardados por expertos. Sobre fines de siglo y principios de esta centuria, comenzó a investigarse científicamente las causas por las cuales las sales de cura nitradas producían colores y sabores característicos. Los trabajos de Polenske (1891) y Haldane (1901) fueron los primeros en establecer que el color y flavor de las carnes curadas está asociado a la presencia de nitratos de sodio y potasio presentes como impurezas en la sal de cura. Asimismo postularon que los nitratos pueden reducirse a nitritos por procesos naturales o por acción de bacterias y que esto contribuye a la formación de color. Algunos años más tarde del descubrimiento de Polenske, Lehman (1899) y Kissalt (1899) demostraban que el color típico de las carnes curadas era debido al nitrito y no al nitrato y finalmente Haldane (1901), un fisiólogo británico, confirmó la formación de nitrosohemoglobina en carnes a partir de nitrito y hemoglobina.

Por otra parte, en las primeras décadas de este siglo, se determinó que la formación del color estaba asociada al efecto de preservación por lo cual la USDA (United States Department of Agriculture) autorizó el uso de nitrito de sodio con niveles residuales que no excedieran las 200 ppm (Hoagland, 1914; Kerr y col., 1926).

Fue durante este período en que comenzó la investigación acerca de las propiedades antibacterianas de los nitritos. Se estudiaron los efectos que producían las soluciones de curado sobre bacterias anaeróbicas (Tanner y Evans, 1933, a y b; Tanner y Evans, 1934) y la acción bacteriostática del nitrito sobre bacterias del género *Escherichia* y *Pseudomona* (Tarr, 1941, a y b).

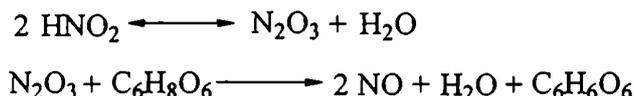
Actualmente los nitritos en la forma de su sal de sodio, son un ingrediente indispensable en carnes curadas (Pierson y Smoot, 1982) puesto que reúnen una variedad de propiedades que ningún otro compuesto posee al ser responsables del color, flavor, propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los precitados productos.

Desde finales de la década de 1950, comenzó a crecer en importancia todo aquello referido a la seguridad del uso del nitrito en productos alimenticios. El descubrimiento de la acción carcinogénica de las nitrosaminas (productos formados a partir de nitritos por su interacción con aminos) generó preocupación en investigadores de la salud y tecnólogos alimentarios por la presencia de estos productos en la dieta humana a partir, especialmente, de carnes curadas. Estas investigaciones y las posibles vías de solución para este problema serán tratados en los próximos ítems.

b) Uso del nitrito.

El embutido listo para la venta debe exhibir un atractivo y estable color rojo. Con este fin, se utilizan las sustancias curantes : sal curante de nitrito o nitrato de sodio o potasio. En el caso de emplear éste último, se produce la reducción de nitrato a nitrito por efecto de las llamadas nitrato reductasas bacterianas (Frey, 1995). El desarrollo del color en las carnes

curadas es el resultado de la reacción entre el nitrito y la mioglobina, una proteína presente en el tejido muscular de la carne (Draudt y Deatherage, 1956; Fox, 1966; Bard y Townsend, 1971; Cassens y col., 1979). En un primer paso, el nitrito se reduce a óxido nítrico, el cual reacciona con la mioglobina formando nitrosomioglobina. Así como la reducción de nitrato a nitrito se producía por acción microbiológica, la reducción de nitrito a óxido nítrico se produce mediante procesos químicos. El producto más utilizado es el ácido ascórbico así como su sal sódica, el ascorbato de sodio. Ambos son reductores lo suficientemente fuertes como para generar la cantidad óptima de óxido nítrico, a través de la siguiente reacción :



La transformación de ácido ascórbico en dehidroascórbico genera un menor rendimiento a medida que transcurre la reacción. Por lo general, llegado ese punto, el enrojecimiento ya ha avanzado lo suficiente. Luego, durante el tratamiento térmico, la mioglobina es desnaturalizada a un compuesto más estable, dinitrosilhemocromo, de color rosa (Fox, 1994). La constante de afinidad entre el óxido nítrico y el grupo hemo es varios miles de veces superior a la del oxígeno o monóxido de carbono (Lee y Cassens, 1976) lo cual indica el alto grado de estabilidad del color formado.

Numerosos estudios (Kerr y col., 1926; Herring, 1973; Hustad y col., 1973; Sebranek y col., 1977; Sales y col., 1980) han reportado las cantidades de nitrito necesarias para el desarrollo de un color aceptable para una mayoría de consumidores; éstas oscilan entre 20 y 70 ppm según el tipo de producto a curar (jamón, tocino, salchichas, carne de cerdo, etc.). No se han detectado diferencias de color en tests de aceptación entre consumidores de frankfurters conteniendo 40 y 150 ppm de nitrito (Sales y col., 1980) ni entre 52 y 156 ppm (Sebranek y col., 1977).

La modificación del flavor de la carne fresca es otra de las acciones fundamentales que el nitrito ejerce sobre la carne curada. Algunos estudios han determinado la relación existente entre la concentración de nitrito y el flavor desarrollado. Los primeros reportes en este sentido datan de 1940 y se multiplicaron en las décadas siguientes (Brooks y col., 1940; Ockerman y col., 1964; Cross y Zeigler, 1965; Piotrowski y col., 1970; Mottram y Rhodes, 1974; Gray y col., 1981). Se analizaron productos curados con concentraciones de nitrito entre 0 y 160 ppm, verificándose mayor aceptación por parte de un panel de consumidores para aquellos productos con mayor contenido de nitrito (Wasserman y Talley, 1972; Hustad y col., 1973; Simon y col., 1973; Mottram y Rhodes, 1974; McDougall y col., 1975).

Con respecto a la acción antioxidante del nitrito, es posible afirmar que la adición del mismo a la sal de cura genera un decrecimiento en la acción oxidativa, aún en presencia de cloruro de sodio, el cual es un reconocido promotor de rancidez (Watts, 1954; Rust y Olson, 1973). Se han reportado presencia de off - flavors propios de la rancidez en tocinos y jamones

con bajos niveles de nitrito (por debajo de 15 ppm) que no existen cuando la concentración alcanza las 170 ppm (Herring, 1973). Asimismo, distintos reportes mencionan una significativa reducción de off - flavors mediante el agregado de nitrito en sistemas modelo lipídicos conteniendo Fe^{+2} o Fe^{+3} - EDTA (McDonald y col., 1980, a) y en carne de cerdo almacenada (McDonald y col., 1980, b y c). El efecto del nitrito sobre el enranciamiento se debe probablemente a que el hierro del grupo hemo, nitrito mediante, permanece en su forma reducida (Fe^{+2}) que no funciona como catalizador de las reacciones de oxidación (Townsend y Olson, 1994). Otros mecanismos postulados son la estabilización de lípidos de membrana o la formación de derivados de nitrito con actividad antioxidante específica (Pearson y Gray, 1983).

c) Propiedades antimicrobianas.

El rol del nitrito como preservador comenzó a ser estudiado en la década de 1930 (Tanner y Evans, 1933, a y b; Tanner y Evans, 1934). Unos años después, Tarr concluyó que concentraciones de nitrito del orden de 200 ppm eran suficientes para inhibir una amplia variedad de bacterias en pescados y medios de cultivo con un pH = 6,0. Entre los géneros inhibidos figuran *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Pseudomona* (Tarr, 1941, a y b; Tarr, 1942). En experimentos similares, Tarr (1944) determinó que 200 ppm de nitrito a pH = 5,6 o menor, eran suficientes para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. En este último experimento, se demostró que la dependencia de la inhibición con el pH es muy fuerte : una concentración de nitrito de 1 % p / p resulta bactericida para *Staphylococcus aureus* y otros anaerobios facultativos a pH = 5,6 pero no a pH = 7,2. Otros investigadores (Castellani y Niven, 1955; Lechowich y col., 1956; Shank y col., 1962; Duncan y Foster, 1968) reportaron que el microorganismo *Staphylococcus aureus* puede tolerar concentraciones altas de nitrito bajo condiciones aeróbicas y no bajo anaerobiosis, mostrando que otro factor a tener en cuenta es la disponibilidad de oxígeno.

Pese a lo antedicho, la más importante función del nitrito en lo que respecta a la preservación es su rol como inhibidor del crecimiento del *Clostridium botulinum* y de la producción de toxina cuando la carne curada es sometida a condiciones de abuso térmico. El uso del nitrito en la sal de cura es considerado el factor clave que le ha permitido a la industria del procesamiento cárnico poseer un notable nivel de seguridad en lo que respecta al botulismo. Indudablemente, una combinación de factores (pH ácido, presencia de cloruro de sodio, tratamiento térmico, adecuada manipulación de materia prima, potencial redox, actividad de agua, empaque de producto final, almacenamiento a temperatura de refrigeración, presencia de flora saprófita competidora, etc.) es la responsable de la seguridad de dichos productos pero la acción del nitrito no puede ser omitida (Silliker y col., 1958; Silliker, 1959; Roberts e Ingram, 1966; Pivnick y col., 1969; Duncan, 1970; Johnston y Loynes, 1971; Riemann y col., 1972; Riemann, 1973; Roberts e Ingram, 1973; Roberts, 1975; Lechowich y col., 1978; Sofos y col., 1979; Smoot y Pierson, 1979). Se cree que el nitrito no inhibe el proceso de conversión de espora a célula vegetativa sino la posterior división celular para multiplicarse y dar colonias (Townsend y Olson, 1994).

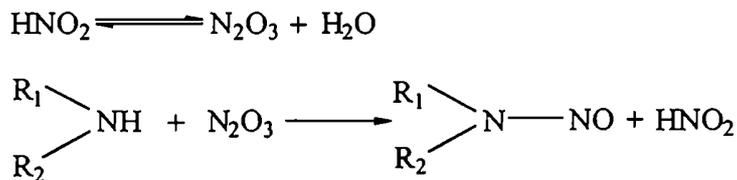
Otros ingredientes presentes en carnes curadas como ascorbato, isoascorbato, polifosfatos, sacarosa y otros azúcares, antioxidantes, quelantes, componentes de humos, especias y otros aditivos actúan como coadyuvantes de los factores ya expuestos, con el fin de otorgar una mayor seguridad y aumentar la vida útil (Sofos y Busta, 1980; Pierson y Smoot, 1982).

Las concentraciones de nitrito requeridas para una adecuada protección botulínica son mayores que aquellas necesarias para el desarrollo de color y flavor (Sofos y Busta, 1980). La actividad antibotulínica se incrementa con la concentración residual de nitrito; el nitrato no es esencial para la estabilidad del producto y probablemente sólo es útil como fuente de nitrito (Bulman y Ayres, 1952; Riemann, 1963; Hustad y col., 1973; Christiansen y col., 1973; Christiansen y col., 1974; Christiansen y col., 1975).

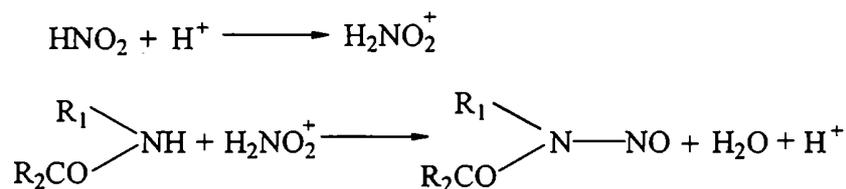
d) Toxicidad.

Pese a su innegable utilidad en el proceso de curado de carnes, la presencia de nitritos en alimentos genera fuertes críticas debido a su toxicidad. Desde principios de siglo, el consumo de nitratos y nitritos y su consecuencia sobre la salud ha ido acaparando un creciente interés por parte de especialistas en las áreas de salud y de tecnología de alimentos. Tannenbaum (1976) reportó que 300 mg / kg de peso corporal representa una dosis letal. Otros estudios han demostrado que el nitrito actúa como un agente hipotensivo (Rubin y col., 1963), afecta las funciones tiroideas (Emerick y col., 1963), es mutágeno (DiFate, 1977) y carcinogénico (USDA, Fed. Regist., 1978; Newberne, 1979). A este panorama se le debe sumar el conocido efecto del nitrito como bloqueante del transporte de oxígeno en los eritrocitos (Pierson y Smoot, 1982).

El amplio uso que se hace del nitrito en carnes curadas genera un interés especial en la formación de productos tóxicos en estas condiciones. Se ha demostrado que el nitrito posee el potencial de reaccionar con grupos amino secundarios presentes en carnes generando *N*-nitrosocompuestos (*nitrosaminas*) de elevado y reconocido poder carcinogénico (Lijinsky y Epstein, 1970; Fazio y col., 1971; Sebranek y Cassens, 1973; Crosby y Sawyer, 1976) a través de reacciones como la siguiente :

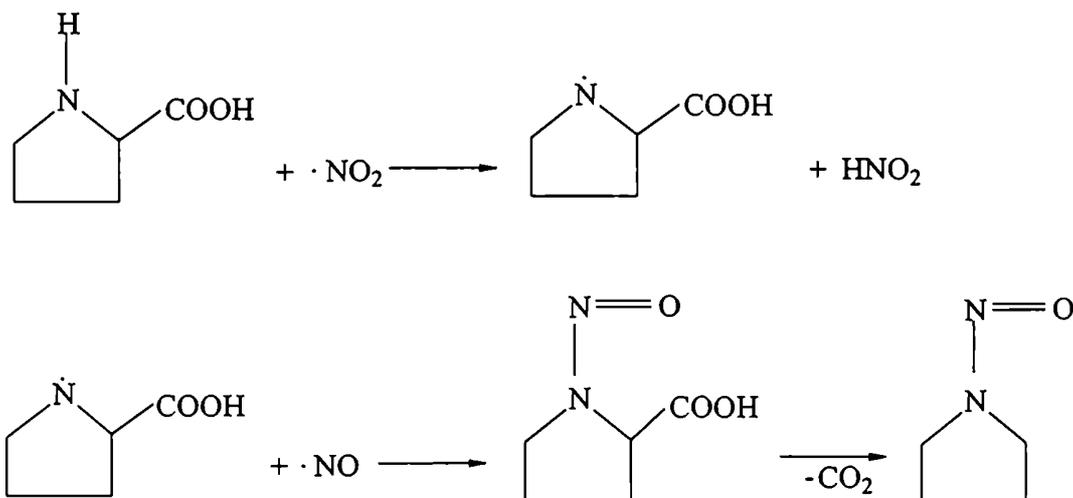
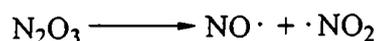


Asimismo, el nitrito es capaz de reaccionar con amidas para producir nitrosamidas a través del siguiente mecanismo :



El mecanismo de la acción de estos compuestos implica la descomposición de la molécula de nitrosamina en reactivos electrófilos de corta vida media, los cuales pueden reaccionar con sitios nucleofílicos de las bases del DNA. Algunas de estas alteraciones no son reparables y son la causa de mutaciones y alteraciones irreversibles en el material genético, lo que puede conducir a la generación de tumores.

Alrededor de 65 diferentes nitrosaminas fueron encontradas en alimentos tan diversos como quesos, carnes o bebidas alcohólicas, siendo la N - nitrosopirrolidina y la dimetilnitrosamina las más comunes (Huhtanen y Wasserman, 1975). En 1972, la USDA reportó la presencia de N - nitrosopirrolidina en tocino; dosajes posteriores arrojaron como resultados niveles de nitrosopirrolidina de 108 ppb (Fazio y col., 1973) y 139 ppb (Havery y col., 1976). Dicha sustancia ya había sido detectada en tocino años atrás (Bullman y Ayres, 1952) y el mecanismo de reacción para su formación fue postulado por Bharucha y col. (1979) y consta de los siguientes pasos :



Estudios realizados sobre estas moléculas arrojaron resultados inequívocos : el daño hepático provocado en animales es directamente proporcional a la ingestión de alimentos conteniendo dimetilnitrosamina y otras similares (Magee y Barnes, 1956; Ender y col., 1964; Lijinsky y col., 1972). Resulta importante destacar que algunos investigadores estiman que sólo el 25 o 30 % del consumo de nitrito corresponden a carnes curadas; el remanente es generado por otras fuentes o por acción de la microflora bacteriana de la boca y saliva que reducen el nitrato presente en aguas y vegetales (Rubin, 1977; Tannenbaum y col., 1978).

En virtud de estos inquietantes resultados, en julio de 1974 la USDA realizó las siguientes recomendaciones :

- ◆ Investigar el posible uso de preservadores alternativos con el fin de reducir el tenor de nitrito proveyendo adecuada protección contra la producción de toxina botulínica en carnes curadas.
- ◆ Restringir el uso de nitrato a carnes curadas deshidratadas o a embutidos fermentados.
- ◆ Limitar el uso de nitrito de sodio a carnes enlatadas (50 ppm).
- ◆ Eliminar nitritos y nitratos de alimentos cárnicos para niños.
- ◆ Limitar el uso de nitrito a 156 ppm en todos los embutidos curados cocidos y en las carnes cocidas curadas con excepción del tocino.

La nitrosación implica una reacción entre un compuesto nitrogenado y un agente nitrosante. Una rápida reacción de este último con un agente adecuado podría inhibir la nitrosación. El ácido ascórbico es particularmente efectivo a este respecto, principalmente en su forma ionizada (aunque la forma protonada también es reactiva). Por otra parte, su carácter de nutriente le permite ser agregado en cantidades relativamente grandes con el fin de inhibir la nitrosación (Kyrtopoulos, 1987). El ácido ascórbico no ejerce efecto sobre los N - nitroso derivados de aminas, lo cual indica que su acción se limita a reducir o eliminar la formación de N - nitrosocompuestos a través de la ya mencionada reacción con nitrito (Item 3 - b, "Uso del nitrito"). Algunos derivados del ácido ascórbico como el palmitato de ascorbilo resultan sumamente eficientes para reducir el tenor de nitrosaminas debido a su solubilidad en la fase lipídica pues es en esta fase en las cuales las nitrosaminas son frecuentemente encontradas (Bharucha y col., 1979). La reacción entre ácido ascórbico y nitrito implica la reducción del nitrito a óxido nítrico siendo el ácido ascórbico oxidado a ácido dehidroascórbico. Los datos cinéticos disponibles muestran que en ausencia de catalizadores, la constante de velocidad de la reacción entre nitrito y ácido ascórbico es de dos a cuatro órdenes de magnitud más grande que la de la nitrosación de aminas (Mirvish, 1975). De todas formas, si bien es aceptado que la presencia de ácido ascórbico disminuye el riesgo de formación de nitrosaminas, ningún reporte confirma que éstas desaparecen por el sólo agregado del mencionado aditivo. Otros compuestos de base fenólica como los tocoferoles o el propilgalato son efectivos en la

inhibición de formación de nitrosaminas (Gray y Dugan, 1975; Fiddler y col., 1987).

e) Posibles sustituyentes.

La discusión generada acerca de los efectos tóxicos que acarrea la presencia de nitritos en carnes curadas motivó por igual a investigadores de la salud y tecnólogos alimentarios a intentar reemplazarlo por algún sustituto no tóxico con todas sus útiles propiedades. Hasta hoy, ese sustituto no ha sido descubierto. Una aproximación para resolver el problema ha sido la investigación del uso de un nivel menor de nitrito en combinación con algún otro compuesto en carnes procesadas; este compuesto debería ser seguro para el consumo humano (por sí mismo y por los posibles productos que se generen), debería inhibir la formación de *Clostridium botulinum* y ser organolépticamente apto para el gusto de los consumidores. Numerosas investigaciones se han orientado hacia la resolución de esta cuestión; en las últimas décadas se ha estudiado una amplia variedad de compuestos antimicrobianos y combinaciones de los mismos que aparentemente podrían alcanzar dichos objetivos. Entre las sustancias más promisorias a este respecto se encuentran los parabenos, el ácido láctico y el sorbato de potasio.

Los *parabenos* son ésteres de cadena corta del ácido parahidroxibenzoico y son preservadores comúnmente utilizados en la industria alimenticia desde hace varias décadas (Aalto y col., 1953; Shibasaki, 1969; Chichester y Tanner, 1972). Ante la necesidad de un sustituto parcial del nitrito en productos cárnicos, se investigó su acción antibotulínica obteniéndose satisfactorios resultados al aplicarlos en medios de cultivo (Robach y Pierson, 1978; Dymicky y Huhtanen, 1979; Sebranek, 1979). Sin embargo, su efectividad se reduce considerablemente al ser agregados a carnes curadas debido a su tendencia a solubilizarse en la fase lipídica. Este factor resulta crítico a la hora de evaluar la potencial idoneidad de los parabenos como sustitutos de nitrito (Deibel, 1979; Pierson y Smoot, 1982).

Otra alternativa mencionada es el empleo de *ácido láctico*. El uso de cultivos de bacterias lácticas con el fin de reducir el pH de productos alimenticios a través de la fermentación de carbohidratos es un tradicional método de preservación, que ha sido ampliamente utilizado en la industria alimenticia (lácteos, salsas, etc.). En 1979, Goodfellow reportó que el uso de ácido láctico en tocino y jamones permite reducir el tenor de nitrito (y en consecuencia la formación de nitrosaminas) sin perjuicios en lo que respecta a la acción antibotulínica. Sin embargo, se ha reportado la formación de “off - flavors”, es decir, la presencia de aromas y sabores que no son aceptables por los consumidores de productos cárneos (Pierson y Smoot, 1982) lo cual es una severa desventaja para la aplicación de ácido láctico.

En base a lo ya expuesto, ni los parabenos ni los lactatos representan alternativas válidas al uso de nitrito. En las siguientes páginas, se expondrá una breve síntesis de las propiedades de los *sorbatos*, sus vías de obtención, propiedades físicas, acción antimicrobiana y toxicidad para luego evaluar en forma más exhaustiva las consecuencias de su uso conjunto con nitrito y su factibilidad para reemplazar a éste último en productos cárnicos en base a los estudios y reportes que, sobre el tema, se han publicado en las últimas décadas.

4) ACIDO SORBICO.

a) Características y obtención.

Las propiedades antimicrobianas del ácido sórbico (ácido trans - trans 2,4 - hexadienoico) en la conservación de alimentos fueron descubiertas en la década 1940 - 1950. El compuesto fue aislado por primera vez en Londres en el año 1859 por el químico alemán A. W. Hoffman a partir de la extracción en medio alcalino del aceite de serba (*Sorbas aucuparia*). La estructura fue descrita por primera vez en el período 1870 - 1890 y su primera síntesis fue llevada a cabo por O. Doebner en 1900. En 1945, C.M. Gooding y The Best Foods patentaron en los Estados Unidos el uso de ácido sórbico como agente antifúngico y a partir de ese momento los estudios acerca del uso, propiedades y aplicaciones del compuesto como antimicrobiano se multiplicaron.

El ácido sórbico y sus sales solubles en agua, en particular el *sorbato de potasio*, son colectivamente denominados sorbatos. El sorbato de potasio es de gran importancia en virtud de su alta solubilidad en agua. A 25 °C, la solubilidad del ácido sórbico es 0,16 % p / p, lo cual constituye una severa desventaja, mientras que la del sorbato de potasio se encuentra por encima del 50 % p / p. La solubilidad se incrementa por el aumento del pH o la temperatura (Sofos y Busta, 1981). En el **Cuadro 1 - 1** se describen las propiedades físicas más importantes del ácido sórbico y del sorbato de potasio.

Diferentes procesos han sido probados y patentados para la obtención del ácido sórbico y sus derivados. El proceso de obtención de la fuente natural (separación del sorbato de la serba) involucra las siguientes operaciones : molienda de las bayas, lixiviación con agua para obtener un jugo, 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 producto puro (Lee y col., 1972).

En la producción comercial, se emplean fundamentalmente dos métodos :

i) *Oxidación de 2,4 hexadienal* (obtenido a partir de la condensación de tres moléculas de acetaldehído o de la condensación entre acetaldehído y crotonaldehído). Se requieren catalizadores específicos para lograr la completa oxidación del sustrato y evitar reacciones secundarias que disminuirían la conversión del reactivo. Es muy poco utilizado en la actualidad.

ii) *Condensación entre cetena y crotonaldehído*. En función del catalizador utilizado y de las condiciones de trabajo, existen dos vías de reacción posibles. Cuando se emplea ácido bórico o sales de zinc como catalizadores, cetena y crotonaldehído condensan, formándose una β - lactona como intermediaria, la cual puede pirolizarse para producir ácido sórbico. En presencia de ácidos fuertes la cetena y el crotonaldehído forman un acetoxicompuesto, el cual polimeriza. La conversión del polímero en ácido sórbico puede llevarse a cabo por calentamiento en medio ácido (ácido clorhídrico) o alcalino (hidróxido de sodio) empleando

como catalizadores metales alcalinos, cloruro de zinc, butanol, ácido acético, ácidos inorgánicos, hidróxidos o combinaciones. Este proceso (en cualquiera de sus dos vías posibles) es el más utilizado en la actualidad para la producción comercial de ácido sórbico. Un esquema de las reacciones involucradas en los procesos i) y ii) puede visualizarse en el Cuadro 1 - 2.

CUADRO 1 - 1. Propiedades físicas del ácido sórbico y el sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Características generales ácido monocarboxílico α - β insaturado, de cadena lineal, isómero trans - trans. Su grupo carboxilo es altamente reactivo, lo que facilita reacciones de neutralización y esterificación.

	<i>ACIDO SORBICO</i>	<i>SORBATO DE POTASIO</i>
Nombre	Acido 2,4 hexadienoico	sal de potasio del ácido 2,4 hexadienoico
Fórmula	$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$	$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOK}$
Peso molecular	112,13 g	150,22 g
Constante de acidez	$1,73 \cdot 10^5$	
Punto de fusión	132 - 137 °C	Descomposición a 270 °C
Sol. en agua (20 °C)	0,15	58,20
Sol. en agua (50 °C)	0,55	61,00
Sol. en agua (100 °C)	4,00	64,00
Sol. en metanol (20 °C)	12,90	16,00
Sol. en etanol (20 °C)	12,90	2,00
Sol. en acetona (20 °C)	9,20	0,10
Sol en benceno (25 °C)	2,34	< 0,01

Posteriormente a su síntesis, el ácido sórbico debe ser purificado y estabilizado para su venta y posterior uso como preservador. El proceso de purificación incluye diversos tratamientos posibles : agregado de hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y carbón activado (Sato, 1980); destilación y cristalización en atmósfera de nitrógeno (Nakamura y Nakajima, 1970); lavado, destilación y secado al vacío (Minoda y Niioda, 1970; Fernholz, 1961), entre otros.

Las sales alcalinas del ácido sórbico se obtienen mediante la neutralización de este último con sales metálicas alcalinas (hidróxidos y alcóxidos de sodio y potasio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio) en presencia de aditivos como acetona, gases inertes (N₂, Ne), antioxidantes y alcoholes. Esta neutralización puede realizarse por diversos procedimientos (Kerr, 1966; Minamidate y col., 1973; McCarthy y Eagler, 1976; Noeltner y col., 1980).

Al igual que otros ácidos lipofílicos usados como preservadores, la acción del sorbato es más pronunciada a pH ácido, puesto que la acción antimicrobiana de ácidos conteniendo de 1 a 14 átomos de carbono está asociada a su fracción no disociada y no al anión ácido (Sofos, 1989). El sorbato es más efectivo a valores de pH cercanos a su pKa = 4,75; a este pH el 50 % se encuentra en su forma no disociada. Sin embargo, se cree que hasta pH de 6,0 - 6,5, ejerce acción inhibitoria (Sofos y Busta, 1981). Eklund (1983) reportó que a pH = 6,0 ó mayor, el 50 % de la acción inhibitoria se debe a la forma disociada; sin embargo, la capacidad de ésta es de 10 a 600 veces menor. En el Cuadro 1 - 3 es posible observar como varía el grado de disociación en función del pH.

CUADRO 1 - 3. Grado de disociación del ácido sórbico en función del pH (Sofos y Busta, 1981).

<i>pH</i>	<i>Acido no disociado (%)</i>
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

b) Acción antimicrobiana.

Los sorbatos constituyen uno de los preservadores de mayor importancia comercial y de más amplia aplicación : en alimentos para hombres y animales, productos farmacéuticos y cosméticos, etc. En base a numerosos estudios se ha establecido que los sorbatos inhiben el crecimiento de hongos y levaduras así como el de muchas bacterias. Son importantes en el desarrollo de alimentos de humedad intermedia porque en ellos la actividad acuosa es suficientemente baja para controlar el crecimiento de bacterias pero no el de hongos y levaduras (Sofos y Busta, 1981; Liewen y Marth, 1985). Las concentraciones efectivas de sorbatos en muchos alimentos están en el rango de 0,05 % - 0,30 % p / p.

La efectividad de los sorbatos frente a las levaduras ha sido reportada por un gran número de investigadores (Emard y Vagn, 1952; Ferguson y Powrie, 1957; Geminder, 1959; Pederson y col., 1961; Huang y Armstrong, 1970). La concentración de sorbato necesaria para inhibir el crecimiento de levaduras se encuentra en el rango de 0,0025 a 0,2 % p / p. Las levaduras inhibidas por la presencia de sorbatos incluyen los géneros *Brettanomyces*, *Byssoclamys*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Mycoderma*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torula*, *Torulasporea*, *Torulopsis*, *Trichosporon* y *Zygosaccharomyces*. La inhibición de levaduras es especialmente importante en alimentos ácidos como mermeladas, jaleas, golosinas, salsas de tomate o aderezos (Restaino y col., 1982; Liewen y Marth, 1985).

Estudios exhaustivos han documentado la efectividad del sorbato contra hongos (Emard y Vagn, 1952; Deuel y col., 1954, a y b; Melnick y col., 1954, a, b y c; Melnick y col., 1956; Huang y Armstrong, 1970; Baldock y col., 1979; Kaul y col., 1979). Entre los géneros de hongos inhibidos por sorbatos se encuentran *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Byssochlamys*, *Cephalosporium*, *Cercospora*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Helminthosporium*, *Humicola*, *Heterosporium*, *Monilia*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Oospora*, *Papularia*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pestalotiopsis*, *Pullularia*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Rosellinia*, *Sporotrichum*, *Stagonospora*, *Stysanus*, *Thielavia*, *Trichoderma*, *Trichophyton* y *Truncatella*. La mínima concentración inhibitoria está en el rango de 0,001 a 0,1 %. Diversos estudios han informado que el sorbato inhibe la producción de micotoxinas en alimentos como aflatoxinas, citrinina, patulina, esterigmatocistina y ocratoxinas (Bullerman, 1983; Bullerman, 1984; Roland y Beauchat, 1984; Roland y col., 1984; Bullerman, 1985; Marshall y Bullerman, 1986; Gourama y Bullerman, 1988). Algunos investigadores han destacado sin embargo que, a niveles subinhibitorios de sorbatos, la producción de micotoxinas se estimula (Gareis y col., 1984; Marshall y Bullerman, 1986).

Los géneros de bacterias inhibidas por sorbatos incluyen *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aerobacter*, *Aeromona*, *Alcaligenes*, *Alteromona*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Yersinia* (Smoot y Pierson, 1981; Sofos y Busta, 1983; Sofos, 1989). En las últimas décadas, ha

cochado gran importancia el estudio del sorbato como agente antibotulínico en la preservación de productos cárnicos (Robach, 1980) en combinación con nitrito de sodio, lo cual será tratado más extensamente en los próximos ítems. Las concentraciones de sorbato necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano oscilan entre 0,001 y 1 % p / p.

El mecanismo por el cual los sorbatos inhiben el crecimiento de microorganismos no está bien definido pero se sabe que los sorbatos bloquean el desarrollo celular y se han postulado distintos mecanismos de acción, entre otros : alteración de la estructura morfológica de la célula, cambios en el material genético, alteración en la membrana celular, inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo o en las funciones de transporte (Sofos, 1989). El sorbato es al menos tres veces más efectivo que el benzoato y cuatro veces más que el propionato en la preservación de alimentos como quesos y pescado (Smith y Rollin, 1954; Boyd y Tarr, 1955; Gooding y col., 1955).

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, etc.

Se ha podido determinar que los alimentos que pueden ser preservados mediante el agregado de sorbatos son productos lácteos, de panificación, frutihortícolas, emulsiones grasas, algunos productos cárnicos (carnes rojas y blancas) y golosinas, empleándose con este fin las concentraciones especificadas en el Cuadro 1 - 4. Es importante destacar que los sorbatos no reemplazan sino que complementan las adecuadas normas de sanidad e higiene.

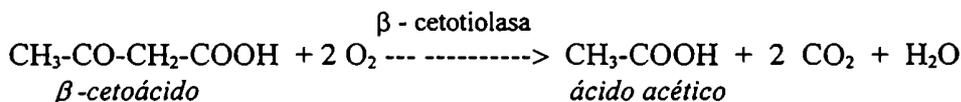
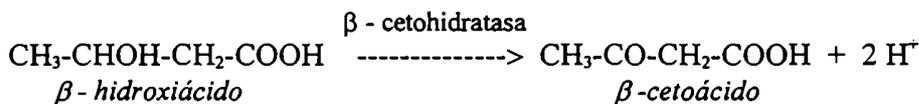
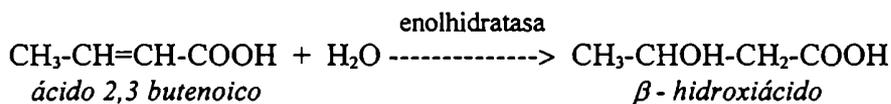
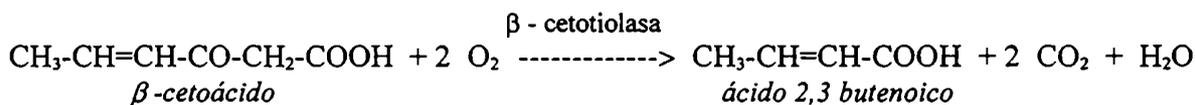
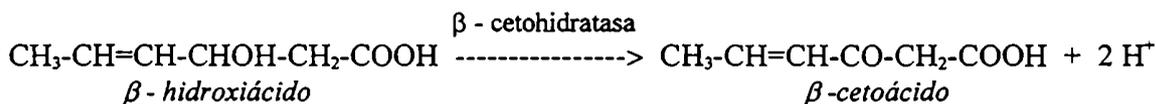
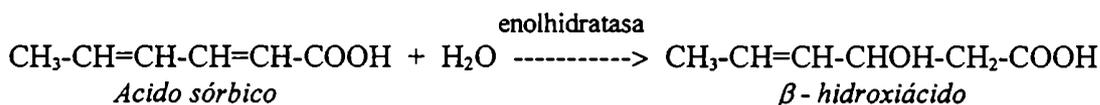
CUADRO 1 - 4. Concentración de sorbato de potasio usada en productos comerciales (Sofos, 1989).

<i>Producto</i>	<i>Cantidad adicionada (%, p / p)</i>
Lácteos	0,05 – 0,30
Panificados	0,03 – 0,30
Vegetales	0,02 – 0,20
Frutas	0,02 – 0,25
Bebidas	0,02 – 0,10
Emulsiones	0,05 – 0,10
Pescado	0,05 – 0,30
Carnes	0,05 – 0,30

c) Toxicidad y metabolismo.

El descubrimiento de las múltiples propiedades que el ácido sórbico presenta para la preservación de alimentos, generó una serie de estudios acerca de su toxicidad y su comportamiento en el metabolismo. En un primer momento, el sorbato fue clasificado como *no tóxico*. Posteriormente, en la década de 1950 se demostró que el sorbato puede ser metabolizado en el organismo a través de una vía similar a la de los ácidos grasos (Deuel y col., 1954, a y b). Este proceso se esquematiza en el **Cuadro 1 - 5**.

CUADRO 1 - 5. Metabolismo de degradación del ácido sórbico (Sofos, 1989).



Productos finales

Según algunos investigadores, en los casos en que la ingesta es elevada, ocurriría una omega - oxidación, similar a la sufrida por ácidos grasos y en ausencia de hidratos de carbono, se producirían acetoacetona y acetona (Deuel y col., 1954, a y b; Lueck, 1980).

Asimismo se ha reportado que el sorbato es más efectivo y menos tóxico que el benzoato (Gooding, 1945; Smith y Rollin, 1954). A diferencia del sorbato, que resulta metabolizable, el benzoato requiere ser detoxificado por el hígado para poder ser excretado. La dosis letal 50 (DL₅₀) del ácido sórbico es de 10 g / kg de peso corporal mientras que la del cloruro de sodio (un aditivo común consumido durante milenios) es de 5 g / kg (Sofos y Busta, 1981). Estudios de este tipo han determinado que los sorbatos sean considerados como aditivos generalmente reconocidos como seguros ("Generally recognized as safe", GRAS) y su uso es permitido por la legislación de numerosos países, entre ellos la Argentina (Código Alimentario Argentino, 1994).

El uso de sorbatos en productos farmacéuticos y cosméticos sólo ha producido reacciones alérgicas en individuos particularmente sensibles (Lueck, 1976). En alimentos, este problema está circunscripto al uso combinado de sorbatos y nitritos y los resultados reportados al momento no son confirmatorios (Paquette y col., 1980).

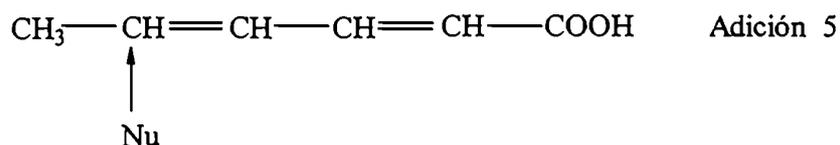
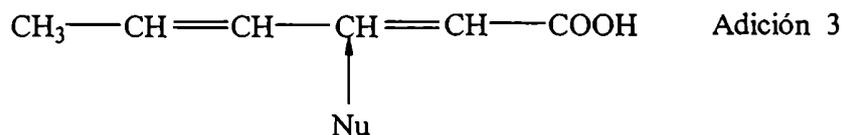
d) Reactividad.

La actividad de los sorbatos es fuertemente dependiente de la composición y características del sistema alimenticio en el cual se encuentre y su efectividad se basa en su presencia a la concentración adecuada. Por ello su destrucción podría afectar la estabilidad de los productos alimenticios que lo contengan.

La presencia de *dobles enlaces conjugados* es una característica que determina el comportamiento químico altamente reactivo del ácido sórbico y sus sales. Es así que, además de la autooxidación que sufre en presencia de oxígeno, puede sufrir reacciones de adición; en presencia de radicales libres polimeriza fácilmente y puede participar en reacciones de Diels - Alder con dienófilos como estireno, acrilatos o anhídrido maleico (Sofos, 1989). Por otra parte, en alimentos complejos, los carbonilos resultantes de la degradación autooxidativa del ácido sórbico pueden reaccionar con aminoácidos determinando la aparición de pardeamiento no enzimático (Gerschenson y col., 1986, a y b; Thakur y Arya, 1991; Campos, 1995; Campos y col., 1995; Campos y Gerschenson, 1996). El análisis del comportamiento del ácido sórbico en sistemas modelo conteniendo azúcares demostró que su destrucción sigue una cinética de primer orden (Gerschenson y col., 1986, a y b). Idéntico resultado se obtuvo al analizar sistemas modelo acuosos conteniendo ácido sórbico y cloruro de sodio (Guerrero y col., 1990).

Un somero análisis de la estructura conjugada del ácido sórbico muestra su susceptibilidad al ataque nucleofílico en las posiciones 3 y 5 (Khandelwal y Wedzicha, 1990, a). Un análisis simple de la naturaleza de la adición nucleofílica a dienos con reactivos del tipo $H^+ Nu^-$, donde Nu^- representa un nucleófilo, envuelve la protonación inicial del dieno y el subsecuente ataque

por el nucleófilo para dar productos de adición. En el caso particular del ácido sórbico, el nucleófilo puede atacar en las posiciones 3 y 5. La mayor deslocalización de la carga en el carbocatión intermediario proveniente del ataque en la posición 5 justifica que éste se encuentre favorecido frente al proveniente del ataque en la posición 3.

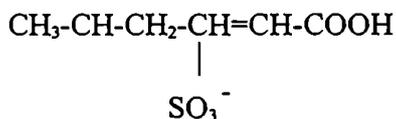


La reacción es completada por adición de H^+ en las posiciones 2 ó 4.

El producto a formarse dependerá de la estabilidad relativa de ambas estructuras de resonancia y su relativa velocidad de reacción con H^+ .

Los alimentos contienen numerosos nucleófilos fuertes (sulfitos, aminas, tioles) por lo que resulta de especial interés la consideración de la naturaleza de estas reacciones. Una reacción adicional y muy importante es la que incluye al nitrito, la cual será tratada más adelante.

La reacción entre el ácido sórbico y el sulfito se encuentra documentada hace varias décadas. Hagglund y Ringbom (1926) reportaron la adición de HSO_3^- que origina el siguiente producto :



En el medio ácido del estómago, este producto de adición es inestable por lo que esta reacción no tiene importancia desde el punto de vista toxicológico.

Por otra parte, el ácido sórbico reacciona con amoníaco, alquilaminas, aminas aromáticas y

bencilamina a altas temperaturas (150 - 200 °C) para formar productos como aminoácidos y dihidropiridonas (Mosher, 1950; Shamma y Rosenstock, 1961; Verbiscar y Campbell, 1964; Kheddis y col., 1981). Cabe destacar que algunos procesos en los cuales el ácido sórbico está presente involucran tratamientos térmicos severos (como por ejemplo el grillado de quesos) similares a las condiciones de formación de productos de adición ácido sórbico - aminas. Sin embargo, no hay evidencia que sugiera que el ácido sórbico pueda reaccionar con aminas simples (como glicina o butilamina) aún bajo condiciones de calentamiento prolongado (Wedzicha y Brook, 1989). Estos mismos autores determinaron que el ácido sórbico reacciona con tioles a 80 °C y pH 3,7 - 5,7. Mediciones cinéticas han mostrado que la reacción del ácido sórbico con mercaptoetanol, ácido mercaptoacético, cisteína y glutatión sigue una cinética de segundo orden (Khandelwal y Wedzicha, 1990, b; Wedzicha y Zeb, 1990, a y b). Los surfactantes como el bromuro de dodeciltrimetil amonio (DoTAB), sulfato de dodecilsodio (SDS), lecitina, éster monoglicérido de ácido diacetil tartárico y Tween 80 muestran un efecto catalítico sobre la adición. El mayor efecto lo produce el DoTAB, el cual acelera la adición de mercaptoetanol en un factor de 21,4 y la de glutatión en 4,6 (Wedzicha y Zeb, 1990, b). La presencia de albúmina sérica bovina (BSA) genera una acción catalítica similar: concentraciones de hasta un 4 % v / v muestran un efecto semejante al del Tween 80 en la adición de mercaptoetanol y ácido mercaptoacético y a la del DoTAB en la adición de cisteína y glutatión (Wedzicha y Zeb, 1991; Wedzicha y Picard, 1993). Al igual que en la reacción con sulfitos, los productos de adición formados son inestables frente al pH ácido del estómago y no tienen en consecuencia efectos toxicológicos.

El ácido sórbico es capaz de reaccionar también con distintos aldehídos aromáticos como vainillina, p - dimetil - aminobenzaldehído o etilvainillina formando compuestos coloreados (Salo, 1963).

Los sorbatos son estables en forma seca pero se degradan en solución acuosa (Arya, 1980). Arya y Thakur (1988) aislaron los compuestos carbonílicos formados en la autooxidación de soluciones acuosas de ácido sórbico y verificaron la existencia de acetaldehído, acroleína, crotonaldehído, malonaldehído y beta - carboxiacroleína. Esta última, en presencia de aminoácidos, polimeriza rápidamente a pigmentos pardos (Arya y Thakur, 1988). Distintos investigadores han postulado mecanismos oxidativos vía formación de peróxidos sobre el doble enlace de la posición 4 - 5 (Pekkarinen, 1969, a y b; Arya, 1980; Arya y Thakur, 1988).

Es necesario destacar que los sorbatos pueden ser degradados o metabolizados por ciertos microorganismos como algunas cepas de *Lactobacillus*, *Pseudomona*, *Acetobacter* y *Leuconostoc* entre las bacterias (Raduchev y Rizvanov, 1963; Liewen y Marth, 1985), *Procandida* y *Candida* entre las levaduras (Deak y Novak, 1972; Edinger y Splittstoester, 1986) y *Penicillium* entre los hongos (Rehm y col., 1964; Marth y col., 1966; Liewen y Marth, 1985). Es posible concluir entonces que el estudio de la estabilidad de los sorbatos se convierte en una herramienta más en la construcción de la estabilidad y larga vida útil de los alimentos procesados. A continuación, se analizará el caso particular de la reacción sorbato - nitrito, enfatizando en la posibilidad de que ambos aditivos sean utilizados en conjunto, de acuerdo a lo expresado en el ítem anterior (Nitritos).

5) USO COMBINADO DE SORBATOS Y NITRITOS.

a) Carnes curadas.

El ácido sórbico es a menudo utilizado en la industria de embutidos cárnicos con el fin de inhibir el crecimiento de hongos durante la maduración del producto. La presencia de sorbatos es común en tripas de embutidos pues mantiene la superficie limpia de bacterias y mohos. Las piezas se sumergen algunos segundos en una solución acuosa de sorbato de potasio 10 - 20 % p / v y con ello se evita en forma duradera la aparición de revestimientos y enmohecimiento (Frey, 1995).

Asimismo, distintos investigadores han reportado que es posible inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum* empleando ácido sórbico o sorbato de potasio solos o combinados con bajas concentraciones de nitrito de sodio (Ivey y Robach, 1978; Sofos y col., 1980; Sofos y Busta, 1980; Sofos y Busta, 1981). La combinación sorbato de potasio y nitrito de sodio en relación 2600 ppm / 40 - 80 ppm en tocino resultó ser más efectiva en la inhibición de la formación de toxina que la adición de 120 ppm de nitrito (Pierson y col., 1979). Trabajos posteriores concluyeron además que los niveles de nitrosopirrolidina eran sustancialmente menores (Pierson y col., 1980; Robach y col., 1980, b). Combinaciones de 2000 - 2600 ppm de sorbato de potasio y 20 - 50 ppm de nitrito de sodio han mostrado ser como mínimo tan inhibitorias de *Clostridium botulinum* y *Clostridium sporogenes* como 156 ppm de nitrito en salchichas de carne vacuna y de cerdo, carnes con salsas y otros productos cárnicos (Sofos, 1989). Los ensayos de aceptación sensorial realizados indicaron que, en general, la presencia de sorbatos no afecta el flavor y / o color del producto (Kahle, 1980).

Desde un punto microbiológico más amplio, la combinación sorbato - nitrito, además de inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum*, inhibe la proliferación de microorganismos mesófilos y psicrófilos en carnes curadas con mayor eficiencia que si se utiliza solamente nitrito (Ledward, 1981). El mismo resultado se obtiene al analizar el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* (Pierson y Smoot, 1982).

En base a estas investigaciones, es posible afirmar que combinaciones de sorbatos y nitritos en la sal de cura permitirían la producción de una carne curada con un menor potencial para la formación de nitrosaminas, protección contra el *Clostridium botulinum* y buena calidad sensorial tomando como parámetros el gusto, aroma y aspecto de los productos alimenticios en cuestión. En base a este hallazgo (y de acuerdo a lo antedicho con respecto a las propiedades de los sorbatos) parecería haberse llegado a una solución en lo que respecta a la posibilidad de disminuir el tenor de nitrito en carnes curadas mediante el agregado de sorbatos.

b) Productos de reacción sorbato - nitrito.

La posibilidad de un eventual reemplazo total o parcial de nitritos por sorbatos generó gran

interés en el ámbito de la investigación sobre preservación de alimentos. Entre las numerosas investigaciones realizadas sobre este tema, algunos científicos (Kada, 1974; Namiki y Kada, 1975; Hayatsu y col., 1975; Khoudokormoff y Gist - Brocades, 1978; Kito y col., 1978; Namiki y col., 1980; Namiki y col., 1981; Osawa y Namiki, 1982, Namiki y col., 1983) informaron la formación de productos con efecto mutagénico a partir de la reacción entre nitritos y sorbatos. Asimismo se ha informado acerca de las condiciones óptimas para la formación de estos compuestos (pH, temperatura, tiempo de reacción y relación sorbato - nitrito), las cuales pueden resumirse en los siguientes ítems :

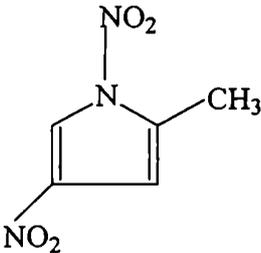
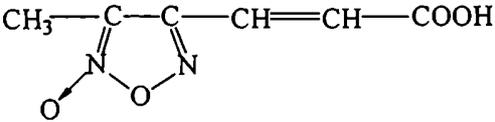
- ◆ la formación de productos de reacción sorbato - nitrito con actividad mutagénica es óptima a altas relaciones molares nitrito : sorbato. La relación ideal es 8 : 1 (Namiki y col., 1980; Namiki y col., 1981). Sin embargo, Hartman (1983) informó que estos productos mutágenos pueden formarse bajo relaciones nitrito / sorbato 2 a 1 y que la actividad genotóxica puede ser detectada hasta una relación 0,2 a 1.
- ◆ la mutagenicidad es producida a un pH entre 2,0 y 5,0, con un máximo a 3,5 - 4,2 (Namiki y col., 1980; Namiki y col., 1981). A pH mayores o iguales que 6,0; es indetectable (Khoudokormoff y Gist - Brocades, 1978).

Es de destacar que otros compuestos presentes en alimentos como la piperina (uno de los principios activos de la pimienta) o el éster metílico del ácido sórbico son capaces de reaccionar con el nitrito de sodio generando mutagenicidad (Osawa y col., 1981; Osawa y Namiki, 1982).

Estos descubrimientos han ensombrecido el panorama acerca del uso combinado de sorbatos y nitritos, si bien estos reportes se refieren a condiciones de reacción distintas a las ofrecidas por un alimento. Si bien ellos no informan acerca de la posibilidad de que sustancias mutagénicas estén presentes en alimentos preservados mediante estos aditivos, ésta no deja de ser una inquietante incertidumbre.

En los ensayos biológicos reportados por Namiki y col. (1981) se mencionan fundamentalmente cuatro productos de reacción sorbato - nitrito estudiados. Sus estructuras pueden verse en el Cuadro 1 - 6. Desde el punto de vista toxicológico, los más significativos son el **1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol** (llamado también compuesto Y) y el **ácido etilnitroso (ENA)**. Estas sustancias arrojan resultados positivos en las tres pruebas ensayadas : el test de Ames (aplicado en *Salmonella typhimurium*), el ensayo rec (aplicado en *Bacillus subtilis*) y la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli B*. El compuesto llamado B (de fórmula $C_5H_6O_4N_2$ y estructura desconocida) da negativo el ensayo de Ames. El compuesto F (una oxima) da resultado negativo en todos los ensayos precitados. También se menciona el precursor de F (pre - F) con características semejantes a aquél. Debido a esto, se afirma que la acción mutagénica se debe a la formación de los productos ENA e Y (Namiki y col., 1981).

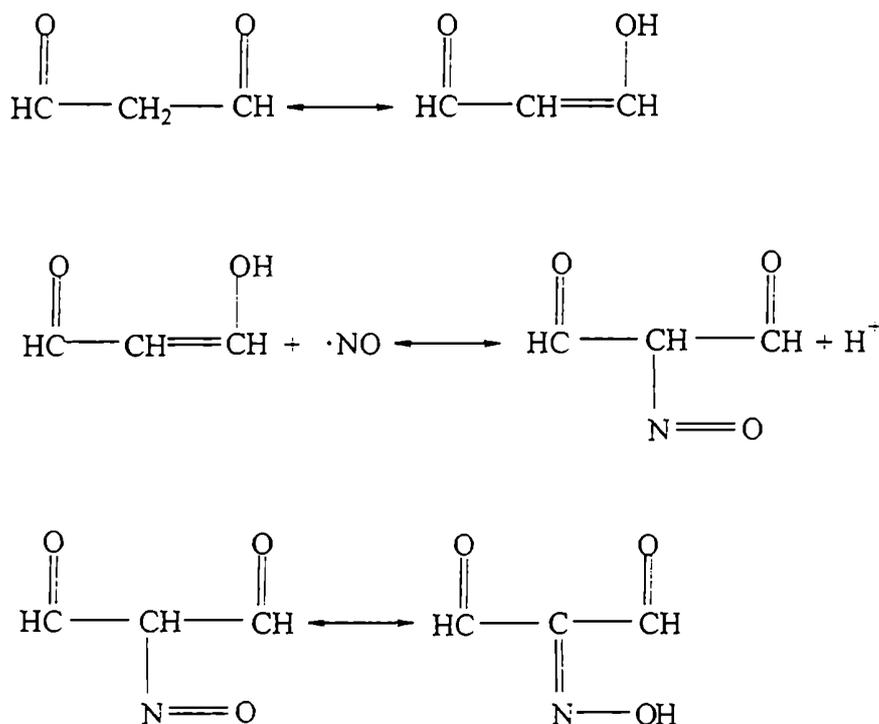
CUADRO 1 - 6. Actividad biológica de los productos de reacción sorbato - nitrito (Namiki y col., 1981).

Producto de reacción	Ensayo rec con <i>B.</i> <i>subtilis</i>	Ensayo de Ames con <i>S.</i> <i>thyphymurium</i> TA98	Ensayo de Ames con <i>S.</i> <i>thyphymurium</i> TA100	Inhib. de crecimiento con <i>E. coli</i>
Acido etilnitroso (ENA) $\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{C} - \text{NO}_2 \\ \parallel \\ \text{NOH} \end{array}$	++	—	+	+ (5 ppm)
1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y) 	+++	++	++	+ (5 ppm)
Compuesto B $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4\text{N}_2$	+	—	—	++ (1 ppm)
Compuesto F 	—	—	—	—

La estructura de *dieno - carbonilo* propia del ácido sórbico parece ser la clave de la reactividad frente al nitrito para la formación de productos como el Y o el ENA, pero el mecanismo exacto de la reacción es desconocido, aunque existen postulados al respecto (Osawa y Namiki, 1982).

Cabe recordar que el nitrito es capaz de reaccionar con lípidos, especialmente aquellos que presentan dobles ligaduras. Mouloud y col. (1992) han reportado la adición de grupos nitro al doble enlace del ácido oleico (C18 : 1) y la consecuente pérdida del mismo.

El principal reactivo derivado del nitrito es el óxido nitroso, N_2O_3 , el cual puede ser polarizado a $NO^-NO_2^+$ para nitraciones nucleofílicas, con un mecanismo similar al mencionado en el ítem 4 d) de este capítulo (Kooyman y col., 1951). Cabe destacar que la reacción nitrito - sorbato puede ser englobada en el marco de una serie de reacciones que protagoniza el nitrito junto a compuestos carbonílicos así como compuestos que presentan dobles enlaces carbono - carbono activados. Por ejemplo, el nitrito retrasa la aparición de malonaldehído, un producto secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, el cual es un reconocido generador de "off - flavors". El mecanismo de dicha reacción sirve de ejemplo para analizar este tipo de reacciones (Kolodziejska y col., 1990).



Con respecto a la estabilidad térmica de los productos formados por reacción entre nitritos y sorbatos, Namiki y col. (1981) informaron que tanto el Y como el ENA resultan sensibles al

calentamiento; por ejemplo ambos decaen un 37 % en tres minutos bajo condiciones similares a la cocción del tocino y un 80 % en una hora a 100 °C y pH = 6,0.

El ácido etilnitroso ha sido, por otra parte, objeto de estudio en el área farmacológica por su carácter de donante de grupo nitroso ("NO - donador"); se han investigado sus propiedades antitrombóticas y vasodilatadoras llegando a la conclusión que el ENA es un poderoso antitrombótico pero su acción como depresor de la presión arterial es leve (Rehse y col., 1996).

Dado el carácter mutagénico que presentan tanto el Y como el ENA, resulta de suma importancia la investigación acerca de la factibilidad de su formación en sistemas alimenticios. De acuerdo a lo antedicho, resultan de especial interés las carnes curadas pues es en este tipo de productos en donde sorbato y nitrito podrían coexistir, por agregado conjunto en la matriz cárnica o bien por migración del sorbato agregado en la tripa hacia el interior del embutido en donde entraría en contacto con el nitrito (Giannakopoulos y Guilbert, 1986, a y b). Es de hacer notar que el nitrito que se encuentra naturalmente en aguas, vegetales u otros alimentos o el que puede producirse por la reducción bacteriana de los nitratos puede, asimismo, reaccionar con el sorbato agregado como conservador (Walker, 1975).

c) Acción de reductores sobre la reacción sorbato - nitrito.

Dentro de los tópicos a estudiar, la presencia de reductores como ácido ascórbico es especialmente relevante pues, como ya se ha mencionado, numerosos investigadores han reportado que reacciona con nitrito previniendo de esta forma la formación de nitrosaminas tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Mirvish y col., 1972; Guttenplan, 1977; Gray y Randall, 1979; Kyrtopoulos, 1987) principalmente debido a la mayor velocidad de reacción del nitrito con el ácido ascórbico que con los grupos amino secundarios. Estudios químicos acerca de los productos de esta reacción (Obata y col., 1983) permitieron describir las estructuras de las reductonas producidas por la degradación del ácido ascórbico en su reacción con nitrito. Otras sustancias presentes en alimentos como cisteína y algunos compuestos fenólicos presentan similar reactividad. Cabe destacar que existen trabajos reportados sobre este tema que se remontan a cuatro décadas atrás (Bunton y col., 1959).

La acción desmutagénica del ácido ascórbico y cisteína no se limita sólo a prevenir la formación de nitrosaminas sino que también impide, bajo determinadas condiciones, la aparición de ENA e Y en sistemas que contienen sorbato de potasio y nitrito de sodio en su formulación. Asimismo, diversos vegetales (zapallo, nueces de ginkgo) contienen sustancias con propiedades similares. Los trabajos que reportan estudios sobre las estabildades de ENA e Y frente a ácido ascórbico, cisteína y jugos de vegetales (Osawa y col., 1980; Osawa y col., 1986), a distintas condiciones de pH, coinciden en que el ENA no parece ser afectado mientras que el Y decae al aumentar el pH. A un pH de 6,8, por ejemplo, el ácido ascórbico o cisteína en relación molar 8 : 1 con el Y provocan la desaparición de este último. El ENA parece ser mucho más resistente pues el ácido ascórbico parece no afectarlo y decae con cisteína un 40 % bajo una relación molar cisteína / ENA de 8 : 1 y 75 % si la relación molar es

16 a 1. Otros trabajos (Robach y col., 1980, a) reportan que 550 ppm de ascorbato de sodio frente a 2600 de sorbato y 40 de nitrito son suficientes para bloquear la formación de estos mutágenos en tocino. Ellos analizaron también la estabilidad térmica del ENA y concluyeron que es inestable a temperaturas de cocción y que un pH de por lo menos 5,5 en presencia de ascorbato, excluye el riesgo de formación de compuestos mutagénicos en carnes curadas.

d) Migración de sorbatos en tripas de embutidos.

Los fenómenos de difusión juegan un rol importante en las operaciones utilizadas en la industria alimentaria y no se detienen al finalizar el procesado de los mismos sino que continúan durante la etapa de almacenamiento. En alimentos, el tratamiento matemático de los procesos difusivos resulta sumamente complejo debido a la heterogeneidad estructural que los mismos presentan (membranas, tejidos, pieles, envolturas, superficies, poros, multifases, etc.). La calidad de los alimentos resulta a menudo afectada por estos fenómenos difusivos. La presencia de gradientes de concentración en alimentos, originados por estados de no equilibrio, provoca movimientos de agua y / o solutos, especialmente durante largos almacenamientos. Resulta de vital importancia para la estabilidad del alimento el control de dichos movimientos entre las diferentes fases o compartimientos del mismo así como entre el alimento y el medio ambiente. Con este fin, suelen emplearse *films comestibles* ("edible films") para recubrir partes del alimento o el total del mismo. En algunos casos, estos films son utilizados para crear una capa externa (soporte) enriquecida en un aditivo como ser un agente antifúngico, sacarosa, cloruro de sodio, etc. De esta manera, la concentración total de dicho aditivo no es alta y la acción del mismo se concentra en la zona deseada. Para lograr este objetivo, resulta de suma importancia la prevención de la difusión del aditivo desde el film hacia el exterior o hacia el alimento.

El ácido sórbico, en virtud de sus propiedades ya descriptas, suele ser utilizado en films comestibles aplicados a alimentos (embutidos, quesos). En virtud de ello, resulta de sumo interés el análisis de sus propiedades difusivas en dichas superficies pues la migración del ácido sórbico hacia el interior del alimento podría generar proliferación bacteriana en la superficie así como reacciones químicas indeseables en el interior. La difusividad aparente del ácido sórbico en sistemas modelo conteniendo geles fue objeto de estudio en la pasada década (Guilbert y col., 1985; Giannakopoulos y Guilbert, 1986, a) encontrándose que la misma varía en función de la concentración de sorbato, el contenido de agua, la actividad de agua del sistema y la viscosidad. Los valores obtenidos de difusividad a dilución infinita en quesos procesados, crema de castañas y jalea de grosella resultaron ser del mismo orden que los obtenidos en sistemas modelo gelificados conteniendo agua, agar, sacarosa y maltodextrinas. Dichos resultados se observan en el Cuadro 1 - 7. Las difusividades infinitas (D_0) fueron obtenidas por extrapolación a dilución infinita de tres valores independientes de difusión aparente de ácido sórbico para concentraciones de 1,8; 4,5 y 8 μmol de ácido sórbico / g de alimento.

Por lo tanto, la potencial capacidad del ácido sórbico para migrar desde la tripa al interior le permitiría entrar en contacto con el nitrito presente en el relleno y, en consecuencia, generar las condiciones necesarias para la formación de productos de reacción como el Y o el ENA.

CUADRO 1 - 7. Difusividad a dilución infinita (D_0) de ácido sórbico en alimentos, determinados por difusión monodimensional en una columna infinita (Giannakopoulos y Guilbert, 1986, b).

	<i>Humedad (% p / p)</i>	<i>a_w (25 °C)</i>	<i>$D_0 \times 10^{10}$ (m^2 / seg)</i>
Queso procesado	44	0,96	0,80
Jalea de grosella	38	0,88	0,79
Crema de castañas	34	0,90	0,24

e) Legislación actual sobre el tema.

El Código Alimentario Argentino autoriza el empleo de nitrato de potasio o sodio y nitrito de sodio de modo tal que el nitrato residual no exceda los 300 ppm y el nitrito residual los 200 ppm (expresados como nitrato y nitrito de sodio respectivamente). Asimismo permite el agregado de sorbato de potasio a la carne vacuna conservada de humedad intermedia, tanto cruda como cocida, con un máximo de 0,12 % p / p (1200 ppm) pero no está autorizado el uso conjunto de sorbato de potasio y nitrito de sodio en carnes curadas. Sin embargo, las normas del Mercosur autorizan la coexistencia de los susodichos aditivos en salazones crudas (por ejemplo, jamón crudo) con máximos de 200 ppm para sorbato de potasio en tripa y 150 ppm para nitrito de sodio en el relleno. En embutidos secos (chorizo, longaniza, salamines) se permite el agregado de 200 ppm de sorbato de potasio en la tripa y de 150 ppm de nitrito de sodio en el relleno. Sin embargo, como ya fue mencionado, existe la evidencia que el sorbato es capaz de migrar de la tripa hacia el relleno. Cabe mencionar que estas normas, al entrar en vigencia la reglamentación del Mercosur, reemplazarán a las actuales vigentes del Código Alimentario Argentino.

La legislación actual de la Unión Europea permite que un 1 % de la composición de la tripa contenga aditivos entre los cuales figura el ácido sórbico siempre y cuando su concentración no supere los 2 mg / dm² de superficie de embutido (Council of European Economic Community, 1983). En los Estados Unidos, se permite la inmersión de embutidos secos en una solución de sorbato de potasio al 10 % p / v en solución acuosa, antes o después de la cocción (Code of Federal Regulations, FDA, 1995). En ambas legislaciones, no se autoriza el uso conjunto de ambos aditivos en rellenos de embutidos.

6) OBJETIVOS DEL TRABAJO PROPUESTO Y RELEVANCIA DEL MISMO.

Como se puede observar, muchos trabajos referentes al uso conjunto de sorbato y nitrito en alimentos parecen ser contradictorios entre sí o bien desarrollados en condiciones tales que no permiten afirmar o negar la formación de los precitados compuestos mutagénicos. En este trabajo se intenta contribuir al esclarecimiento de estas cuestiones y realizar un aporte original en un área trascendental de la tecnología de alimentos como lo es el desarrollo de métodos eficaces e inocuos de preservación.

De acuerdo a lo antedicho, el objetivo del presente trabajo es el estudio de la formación de productos de reacción sorbato - nitrito en alimentos.

7) ANTECEDENTES.

Este objetivo reconoce como antecedente :

a) estudios previamente desarrollados en el Departamento de Industrias (F.C.E. y N., U.B.A.) con el fin de determinar la cinética de destrucción del ácido sórbico en sistemas modelo conteniendo distintos humectantes (glucosa, sacarosa, cloruro de sodio, glicerol), modificadores de pH (ácido cítrico o fosfórico), aminoácidos y aditivos (Gerschenson y col., 1986, a y b; Gerschenson y col., 1987; Guerrero y col., 1990; Campos, 1995; Campos y col., 1995; Gerschenson y Campos, 1995; Campos y col., 1996; Campos y Gerschenson, 1996; Campos y col., 1997).

b) estudios previamente desarrollados en el Departamento de Industrias (F.C.E. y N., U.B.A.) con el fin de determinar la cinética de destrucción del ácido sórbico en sistemas cárnicos (Campos y col., 1991; Campos, 1995).

c) estudios previamente desarrollados por el Departamento de Industrias en colaboración con el Mass Spectrometry Research Resource del Health Science Center (Denver, Colorado USA) sobre la formación de compuestos por reacción entre sorbato y nitrito en sistemas modelo (Gerschenson, 1991).

8) ETAPAS DEL TRABAJO REALIZADO.

Sobre la base de lo ya explicitado, se ha desarrollado un trabajo que consta de cuatro etapas, a saber :

Primera parte. Síntesis de ENA e Y con la finalidad de disponer de patrones puros de estas

sustancias y caracterización de la mismas mediante métodos instrumentales (resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa y espectroscopía infrarroja).

Segunda parte. Análisis de la presencia de ENA e Y en sistemas modelo acuosos y sistemas cárnicos conteniendo preservadores (sorbato y nitrito), medios de cultivo y otros aditivos; modelados a distintas condiciones de temperatura, pH y tiempo de proceso. Se confirmó la presencia de estos productos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC - MS).

Tercera parte. Análisis cuantitativo de la presencia de los precitados compuestos mutagénicos en homogenatos cárnicos empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuarta parte. Análisis del contenido de sorbato en embutidos comerciales de consumo común en la Argentina, empleando técnicas desarrolladas en el Departamento de Industrias (F.C.E. y N., U.B.A), con el fin de evaluar si existe agregado de sorbato en productos que han sido tratados con nitrito pues, si bien el agregado conjunto de sorbatos y nitritos no está permitido por el Código Alimentario Argentino, la coexistencia de ambos aditivos no deja de ser una inquietante posibilidad.

Capítulo Segundo

MATERIALES Y METODOS

En todos los sistemas y técnicas descriptos se emplearon reactivos de calidad analítica. Los mismos fueron :

- sorbato de potasio (Sigma, USA).
- nitrito de sodio (Fluka, Suiza).
- cloruro de sodio (Anedra, Argentina).
- caldo cerebro corazón (Merck, Argentina).
- acetato de etilo (Sintorgan, Argentina).
- sacarosa (Anedra, Argentina).
- polifosfatos (Farmesa, Argentina).
- extracto de levadura (Merck, Argentina).
- sulfato de magnesio heptahidratado (Anedra, Argentina).
- ácido sulfúrico (Merck, Argentina).
- ácido tiobarbitúrico (Aldrich, USA).
- dicromato de potasio (Carlo Erba, Argentina).
- sulfato de sodio anhidro (Anedra, Argentina).
- ácido clorhídrico (Cicarelli, Argentina).
- tolueno (Cicarelli, Argentina).
- éter etílico (Merck, Argentina).
- éter de petróleo (Merck, Argentina).
- cloroformo (Sintorgan, Argentina).
- metanol (Sintorgan, Argentina).
- acetonitrilo (Sintorgan, Argentina).
- hidróxido de sodio (Merck, Argentina).
- hidróxido de potasio (Merck, Argentina).
- bromuro de potasio (Merck, Argentina).
- hexano (Sintorgan, Argentina).
- ácido ascórbico (Mallinckrodt, Argentina).
- cloruro de metileno (Merck, Argentina).
- nitroetano (Sintorgan, Argentina).
- sílica gel (Merck, Argentina).
- cisteína (Sigma, USA).
- helio (La Oxigena, Argentina).

La descriptiva de las técnicas y materiales usados se ha organizado en las siguientes partes :

- ◆ *Primera parte.* Técnicas de obtención de los patrones puros de ácido etilnitrólico (ENA) y 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y).
- ◆ *Segunda parte.* Formulación de los sistemas modelo acuosos y cárnicos estudiados. Técnicas para detectar la presencia de dichas sustancias.
- ◆ *Tercera parte.* Técnica de cuantificación de los precitados compuestos mutagénicos presentes en sistemas cárnicos.
- ◆ *Cuarta parte.* Técnica de dosaje de sorbato utilizada para analizar la concentración de este preservador en productos cárnicos comerciales de venta masiva en la Argentina.

PRIMERA PARTE

Síntesis de patrones puros de ácido etilnitrólico (ENA) y 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y).

En una primera etapa del trabajo realizado se desarrollaron técnicas de síntesis de los compuestos mutagénicos ya mencionados (ENA e Y). Se describirán aquí las susodichas rutas de síntesis junto con las técnicas instrumentales empleadas en la caracterización.

Acido etilnitrólico (ENA).

Se realizó una síntesis de ácido etilnitrólico (ENA) basada en lo reportado por Meyer y Constam (1882) y Namiki y Kada (1975), que consta de las siguientes etapas :

i) *Preparación de reactivos* : como primer paso se prepararon las siguientes soluciones :

- 8,0 g de nitrito de sodio en 15 ml de solución acuosa.
- 6.7 g de hidróxido de potasio en 15 ml de solución acuosa.
- ácido sulfúrico 2M.
- hidróxido de potasio 4M.

ii) *Síntesis* : se colocaron 6 ml de nitroetano en un vaso de 250 ml más un puñado de hielo. Se agregó, gota a gota, 15 ml de solución de KOH y se enfrió con más hielo, agitando suavemente con un bazo magnético e impidiendo que la temperatura sobrepasase los 5 °C. Luego se agregaron de la misma forma los 15 ml de solución de nitrito de sodio; al finalizar esta operación, la temperatura se llevó a 0 °C mediante el agregado de hielo.

Una vez regulada la temperatura, se agregó gota a gota la solución sulfúrica hasta pH = 3 manteniendo la temperatura por debajo de 5 °C. El color de la solución pasó de amarillo a rojo, luego se aclaró hasta un verde pálido. Al llegar a pH = 3, se alcalinizó con la solución de KOH 4M hasta pH = 8 con la mismas precauciones que en la acidificación. Este proceso de ajuste de pH entre pH = 3 y pH = 8 se repitió dos veces más para finalizar acidificando a pH = 3. Finalizada esta etapa, se agitó bajo campana extractora para eliminar los gases formados durante la reacción (NO y NO₂).

iii) *Extracción* : se extrajo con 100 ml de éter etílico tres veces. Al evaporar al vacío mediante un rotavapor Buchi (Suiza), se obtuvieron agujas amarillo pálidas las cuales fueron

recristalizadas de éter etílico para obtener un producto puro de punto de fusión 88 - 90 °C. Para esta última determinación, se utilizó un equipo Fischer - Johns (USA).

iv) *Caracterización* : posteriormente a su obtención, se realizaron estudios de caracterización empleando técnicas de espectrometría de masa, espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear los cuales son reportados en el capítulo de "Resultados". Se utilizaron para ello los siguientes equipos :

MS (espectrometría de masa) se aplicó con el objeto de reconocer los productos de reacción formados y caracterizarlos. Se utilizó el Automated Mass Spectrometry Trio - 2VG (LANAIS, CONICET) con un detector de impacto electrónico de 70 ev, que permitió un análisis de muestra sólida ("masa directa"). Para el caso del ácido etilnitroso, se programó una temperatura inicial de 30 °C y una temperatura final de 400 °C; alcanzándose esta última en un lapso de tres minutos desde el inicio del programa.

NMR (resonancia magnética nuclear) : se empleó un equipo Bruker AC 200 (Alemania) perteneciente al Departamento de Química Orgánica (F.C.E. y N., U.B.A.) de 200 Mhz. para ^1H y 50,3 Mhz. para ^{13}C , disolviéndose la muestra en cloroformo deuterado para ^1H y agua deuterada para ^{13}C . El objetivo de este análisis fue reconocer la estructura de la sustancia analizada.

IR (espectroscopía infrarroja) : se utilizó un equipo Nicolet 510 - P (USA) perteneciente al Departamento de Química Orgánica (F.C.E. y N.; U.B.A.) con el mismo objetivo del análisis anterior. La muestra a analizar (un cristal de ENA) se mezcló con bromuro de potasio formándose de esta forma una pastilla libre de humedad, para evitar la interferencia de la banda OH típica del agua.

1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y).

Su obtención se basa en lo reportado por Namiki y col. (1981) y Kito y col. (1978). Consta de los siguientes pasos :

i) *Síntesis* : se prepararon 100 g de solución acuosa de sorbato de potasio según lo especificado en el Cuadro 2 - 1. Dicha solución fue llevada a la temperatura adecuada por medio de una plancha calefactora Velp Científica (Italia) provista de agitación magnética; luego se agregaron 50 g de una solución acuosa de nitrito de sodio conteniendo las cantidades de nitrito especificadas en el Cuadro 2 - 1. Durante este agregado se mezcló continuamente para homogeneizar el sistema. El pH del mismo se ajustó al valor deseado con un peachímetro Cole Parmer 5800 - 05 (USA) y la temperatura se controló a través de un sensor provisto por el mismo peachímetro. Tanto el pH como la temperatura fueron chequeados permanentemente a lo largo de la síntesis para asegurar el cumplimiento de las condiciones establecidas.

CUADRO 2 - 1. Condiciones de reacción para síntesis de 1,4 - dinitro - 2- metilpirrol (Y).

Masa de sorbato de potasio en 100 g de solución acuosa	2,000 g.
Masa de nitrito de sodio en 50 g de solución acuosa	10,000 g.
Relación molar sorbato - nitrito en el sistema resultante	1 / 8.
Temperatura de la experiencia	60 °C.
Tiempo de reacción	30 min.
pH (ajustado con ácido sulfúrico 1 N)	3,5.

ii) *Extracción* : finalizada la reacción, se llevó la muestra a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, se ajustó el pH a 3,5 por ser éste el pH óptimo de extracción y se extrajo con cloruro de metileno por ser un solvente lo suficientemente selectivo para el compuesto en cuestión (Kito y col., 1978; Namiki y col., 1981). Se secó el extracto con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en rotavapor Buchi (Suiza) para concentrar.

iii) *Análisis cromatográfico* : con el objetivo de evaluar la complejidad de la muestra se realizó el análisis por cromatografía en placa delgada (TLC). Se empleó como solvente cloroformo : metanol 95 : 5 v / v (Namiki y col., 1981) corriendo contra patrón de ácido sórbico. Se utilizaron placas de sílica gel Merck 60 F254 de 0,2 mm de espesor; se reveló con lámpara UV Mineralight de 254 / 336 nm modelo UVGL-25 y como segundo revelador una solución de ácido sulfúrico 2 % en etanol más unas gotas de anisaldehído en un volumen total de 250 ml.

iv) *Purificación* : con el objetivo de aislar el Y del resto de los compuestos formados se armó una columna de 3 cm de diámetro y 50 cm de longitud empleando como solvente de armado tolueno - acetato de etilo en relación 2 : 1 y sílica gel como relleno. La mezcla de solventes elegida presentó similar polaridad y menor toxicidad que cloroformo - metanol 95 : 5. Se eluyó con un gradiente de tolueno - acetato de etilo, partiendo de la relación de armado y finalizando con acetato de etilo puro. La cantidad de muestra sembrada fue de 0,5 g. De las fracciones evaluadas, se identificó la correspondiente al compuesto Y mediante el estudio de su R_f (0,4) y el color amarillo de su mancha sobre la placa (Kito y col., 1978; Namiki y col., 1981).

Con el fin de completar la purificación, se evaporó el solvente correspondiente a esta fracción para obtener un producto sólido, el cual fue recrystalizado empleando como solvente acetato de etilo - hexano 50 : 50 con lo que se obtuvieron 21 mg de una sustancia cristalina

blanca amarillenta cuyo punto de fusión resultó ser 135 - 138 °C lo cual coincide con lo reportado en bibliografía (Kito y col., 1978) para el 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol. Para esta última determinación, se utilizó un equipo Fischer - Johns (USA).

v) *Caracterización* posteriormente a su obtención, se realizaron estudios de caracterización empleando técnicas de espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear los cuales son reportados en el capítulo "Resultados". Se emplearon las técnicas y equipos de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa a continuación descriptas :

MS (espectrometría de masa) : se aplicó con el objeto de reconocer los productos de reacción formados y caracterizarlos. Se utilizó el Automated Mass Spectrometry Trio - 2VG (LANAIS, CONICET) con un detector de impacto electrónico de 70 ev, que permitió un análisis de muestra sólida ("masa directo").

Para el caso del 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol, se programó una temperatura inicial de 60 °C y una temperatura final de 290 °C; alcanzándose esta última en un lapso de doce minutos desde el inicio del programa.

NMR (resonancia magnética nuclear) : se empleó un equipo Bruker AC 200 (Alemania) perteneciente al Departamento de Química Orgánica (F.C.E. y N., U.B.A.) de 200 Mhz. para ^1H y 50,3 Mhz. para ^{13}C , disolviéndose la muestra en cloroformo deuterado. El objetivo de este análisis fue reconocer la estructura de la sustancia analizada.

SEGUNDA PARTE

Análisis de la formación de ENA e Y en sistemas modelo acuosos y en homogenatos cárnicos.

En esta etapa del trabajo realizado, se estudió la formación de ENA e Y en sistemas modelo acuosos y homogenatos cárnicos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Dichos sistemas fueron diseñados con el fin de evaluar la influencia de las distintas condiciones de pH y composición del sistema así como del tiempo y temperatura de reacción en la formación de los compuestos mutagénicos.

En cuanto a composición, deben considerarse, en principio, dos situaciones :

i) Agregado conjunto de sorbato y nitrito en relación 2000 - 2600 ppm / 20 - 80 ppm a un producto cárnico curado con el objeto de disminuir el tenor de nitrito y así desfavorecer el potencial de formación de nitrosaminas (Ivey y Robach, 1978; Sofos y col., 1980; Sofos y Busta, 1980; Sofos y Busta, 1981). Dicho agregado conjunto no está autorizado por las legislaciones europea, norteamericana o argentina. En particular, estudios realizados en Estados Unidos y mencionados en el capítulo de Introducción, hacen hincapié en el posible riesgo de reacciones alérgicas (Paquette y col., 1980). Sin embargo, está latente la posibilidad de que el sorbato sea agregado a productos curados en una cantidad variable con el objeto de aumentar su vida útil o disimular fallas en el manipuleo de las materias primas.

ii) Agregado de 200 ppm de sorbato de potasio en la tripa del embutido y 150 ppm de nitrito en el relleno de embutidos cárnicos acorde a la propuesta del Mercosur, análoga a la norma de la Unión Europea, ya analizada en el capítulo de Introducción, con la consecuente posibilidad de migración de sorbato hacia el interior (Guilbert y col., 1985; Giannakopoulos y Guilbert, 1986, a y b) durante el almacenamiento del producto terminado, que puede extenderse durante meses a temperaturas moderadas. Una situación análoga se encontraría en el caso de agregado de sorbatos a la superficie de un producto cárnico curado (ej; jamón cocido).

En cuanto a los distintos procesamientos a analizar, deben considerarse distintas situaciones :

- i1) Escaldado.
- i2) Ahumado o cocido.
- i3) Curado en crudo.

i4) Almacenamiento de producto terminado.

Las situaciones i1) é i2) se modelaron por calentamiento a 60 °C durante 30 minutos y 5 horas respectivamente. La situación i3), por calentamiento durante 5 horas a 35 °C. El calentamiento durante 5 horas a 60 °C también permite modelar un almacenamiento (i4) mediante un ensayo acelerado y el tratamiento durante 5 horas a 35 °C permitiría evaluar un almacenamiento breve.

Sistemas acuosos.

Se prepararon soluciones acuosas de sorbato de potasio y nitrito de sodio junto con otros aditivos y medios de cultivo. Dichas soluciones fueron llevadas a la temperatura adecuada por medio de una plancha calefactora Velp Scientifica (Italia) provista de agitación magnética; el pH se ajustó al valor deseado con un peachímetro Cole Parmer 5800 - 05 (USA) mediante el agregado de ácido fosfórico y la temperatura se controló a través de un sensor provisto por el mismo peachímetro. Tanto el pH como la temperatura fueron chequeados permanentemente a lo largo de la reacción.

Finalizada la misma, se llevó la muestra a una temperatura de 25 °C, se ajustó el pH a 3,5 por ser éste el pH óptimo de extracción según lo reportado por Kito y col. (1978) y Namiki y col. (1981) y se extrajo con acetato de etilo por ser el solvente que permite la mayor recuperación de los productos de reacción formados (Namiki y col., 1981). Se secó el extracto con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en rotavapor Buchi (Suiza) hasta sequedad para, posteriormente, redisolver en acetato de etilo y analizar mediante GC - MS.

Los sistemas diseñados fueron :

SISTEMA 1 : basado en lo reportado por Namiki y col. (1981), reproduce las condiciones ideales para la formación de productos de reacción sorbato - nitrito.

Sorbato de potasio : 2,000 g.

Nitrito de sodio : 10,000 g.

Agua: 138,0 g.

Relación molar sorbato - nitrito : 1 / 8.

Tiempo de reacción : 30 min.

pH : 3,5.

Temperatura : 60 °C.

Masa total de sistema : 150,0 g.

SISTEMA 2 : se varía el pH (de 3,5 a 5,0), el tiempo de reacción (de 30 minutos a 5 hs.) y la relación sorbato / nitrito (de 1 : 8 en moles a 2000 : 80 en ppm) con el fin de modelar el cocido, ahumado o almacenamiento acelerado de un producto en el cual se haya realizado un

parcial reemplazo de nitritos por sorbatos de acuerdo a lo aconsejado por literatura (Ivey y Robach, 1978; Sofos y col., 1980; Sofos y Busta, 1980; Sofos y Busta, 1981).

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Agua : 1247,4 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 3 : con respecto al sistema precedente, se agrega ácido ascórbico de modo tal que la relación sorbato / nitrito / ascórbico sea de 2000 / 80 / 500. Esta proporción de ácido ascórbico no es arbitraria pues, como señalan Robach y col. (1980, a), esta cantidad simula las condiciones de procesamiento de tocino en los Estados Unidos.

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,625 g. *Relación nitrito - ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Agua : 1246,8 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 4 : varía con respecto al Sistema 3 en el contenido de ácido ascórbico; en este caso se trabajó con una relación molar ascórbico : nitrito 8 / 1 manteniendo las cantidades de sorbato y nitrito. Estas condiciones fueron reportadas por Osawa y col. (1980, 1986) con el fin de disminuir la formación de Y.

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 2,041 g. *Relación molar nitrito - ascórbico : 1 / 8.*
Agua : 1245,4 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.

Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 5 : idéntico al Sistema 4 pero empleando cisteína en lugar de ácido ascórbico. Se intenta comparar las diferencias obtenidas con respecto al sistema anterior (Osawa, 1986).

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Cisteína : 1,400 g. *Relación molar nitrito - cisteína : 1 / 8.*
Agua : 1246,0 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 6 : en este caso, se analizó el efecto mencionado por Osawa y col. (1986) acerca del efecto de la cisteína como inhibidor de ENA y / o Y cuando se encuentra presente en relación molar 16 : 1 con nitrito (en el caso extremo que todo el nitrito hubiera reaccionado para producir Y o ENA).

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Cisteína : 2,800 g. *Relación molar nitrito - cisteína : 1 / 16.*
Agua : 1244,6 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 7 : presenta sorbato, nitrito y medios de cultivo (caldo cerebro corazón y extracto de levadura) cuya presencia busca simular la composición de una carne.

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Caldo cerebro corazón : 54,900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.
Agua : 1184,8 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 8 : consta de los reactivos y condiciones del Sistema 7 más el agregado de 500 ppm de ácido ascórbico.

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,625 g. *Relación nitrito - ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Caldo cerebro corazón : 54,900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.
Agua : 1184,2 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 9 : consta de los reactivos y condiciones del Sistema 7 más el agregado de cisteína en lugar de ácido ascórbico en relación molar 16 / 1 con el nitrito.

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Cisteína : 2,800 g. *Relación molar nitrito - cisteína: 1 / 16.*
Caldo cerebro corazón : 54,900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.
Agua : 1182,0 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 10 : consta de los reactivos y condiciones del Sistema 7 más el agregado de 500 ppm de ácido ascórbico y 5000 ppm de polifosfatos. Este aditivo se agrega en la proporción habitualmente usada con el fin de facilitar la retención de líquidos (Townsend y Olson, 1994).

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,625 g. *Relación nitrito - ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Caldo cerebro corazón : 54,900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.
Polifosfatos : 6,250 g.
Agua : 1177,9 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 11 : consta de los reactivos y condiciones del Sistema 7 más el agregado de 500 ppm de ácido ascórbico, 5000 ppm de polifosfatos y 1 % de sacarosa, comúnmente utilizada para disminuir el sabor salado que le otorga a las carnes curadas el cloruro de sodio (Frey, 1995).

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato - nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,625 g. *Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Caldo cerebro corazón : 54,900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.
Polifosfatos : 6,250 g.
Sacarosa : 12,500 g.
Agua : 1165,4 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 12 : consta de los reactivos y condiciones del Sistema 7 más el agregado de 500 ppm de ácido ascórbico, 5000 ppm de polifosfatos, 1 % de sacarosa y 3.5 % de cloruro de sodio (incluye lo agregado directamente más lo presente en los medios de cultivo).

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0.100 g. *Relación sorbato – nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,625 g. *Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Caldo cerebro corazón : 54.900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.

Polifosfatos : 6,250 g.
Sacarosa : 12,500 g.
Cloruro de sodio : 39,330 g.
Agua : 1126,1 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,0.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 13 consta de los reactivos presentes en el Sistema 12 (en las mismas concentraciones) pero modificando el pH de 5,5 a 5,0 con el fin de acercar las condiciones aún más a las de un producto cárnico.

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato – nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,625 g. *Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Caldo cerebro corazón : 54,900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.
Polifosfatos : 6,250 g.
Sacarosa : 12,500 g.
Cloruro de sodio : 39,330 g.
Agua : 1126,1 g.

Tiempo de reacción : 5 hs.
pH : 5,5.
Temperatura : 60 °C.
Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 14 consta de los reactivos presentes en el Sistema 12 (en las mismas concentraciones) pero con un pH de 5,5 y un tiempo de reacción diferente (30 minutos en lugar de 5 horas) con el fin de simular un proceso de escaldado de un producto cárnico curado.

Sorbato de potasio : 2,500 g.
Nitrito de sodio : 0,100 g. *Relación sorbato – nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,625 g. *Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Caldo cerebro corazón : 54,900 g.
Extracto de levadura : 7,700 g.
Polifosfatos : 6,250 g.
Sacarosa : 12,500 g.

Cloruro de sodio : 39,330 g.

Agua : 1126,1 g.

Tiempo de reacción : 30 min.

pH : 5,5.

Temperatura : 60 °C.

Masa total de sistema : 1250,0 g.

SISTEMA 15 consta de los reactivos presentes en el Sistema 12 (en las mismas concentraciones) pero modificando el pH (5,5 en vez de 5,0) y la temperatura (35 °C) con el fin de simular un proceso de curación en crudo.

Sorbato de potasio : 2,500 g.

Nitrito de sodio : 0,100 g.

Acido ascórbico : 0,625 g.

Caldo cerebro corazón : 54,900 g.

Extracto de levadura : 7,700 g.

Polifosfatos : 6,250 g.

Sacarosa : 12,500 g.

Cloruro de sodio : 39,330 g.

Agua : 1126,1 g.

Relación sorbato – nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.

Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.

Tiempo de reacción : 5 hs.

pH : 5,5.

Temperatura : 35 °C.

Masa total de sistema : 1250,0 g.

Sistemas cárnicos.

A 500,0 g de carne (*biceps femoris*) previamente desgrasada, picada y molida, se le agregó 150,0 g de una solución acuosa conteniendo sorbato de potasio, nitrito de sodio y los restantes aditivos; el sistema resultante se mezcló y homogeneizó mediante un equipo Sorvall Omni Mixer (O.M.N.I. Corp., USA). Durante la homogeneización, el pH fue ajustado mediante el agregado de gotas de ácido fosfórico y controlado con un peachímetro Cole - Parmer 5800 - 05 (USA). De esta forma, se obtuvieron 625,0 g de homogenato cárnico. A continuación, se calentó en baño de agua a la temperatura deseada, agitando en forma manual y controlando permanentemente el pH. Finalizada la reacción, se procedió a extraer agregando 500 ml de una mezcla de solventes conformada por acetato de etilo y hexano en relación 70 / 30, se homogeneizó y centrifugó (10 minutos a 2000 rpm), separando a continuación el sobrenadante. Se repitió el paso de extracción, se reunieron las fracciones sobrenadantes, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron al vacío mediante un rotavapor Buchi

(Suiza). El extracto remanente se redisolvió en 150 ml de éter de petróleo y se extrajo seis veces con 50 ml de acetonitrilo (Curso Regional sobre Determinación de Residuos en Plaguicidas en los Alimentos, INPAZZ, 1995). Este nuevo extracto se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó al vacío, obteniéndose un residuo, el cual fue analizado mediante GC - MS.

SISTEMA 16 : es el primer sistema cárnico analizado; su composición y condiciones de procesamiento intentan simular un proceso de curado en crudo.

Carne : 500,0 g.
Sorbato de potasio : 1,250 g.
Nitrito de sodio : 0,050 g. *Relación sorbato – nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,312 g . *Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Cloruro de sodio : 21,875 g (3.5 %).
Sacarosa : 6,250 g (1 %).
Polifosfatos : 3,125 g (5000 ppm).
Agua : 92,1 g.

pH : 5,5.
Temperatura : 35 °C.
Tiempo de reacción : 5 hs.
Masa total de sistema : 625,0 g.

SISTEMA 17 : con respecto al sistema 16, se varió temperatura y tiempo de proceso, los cuales fueron fijados a 60 °C y 30 minutos para simular las condiciones de preparación de un embutido escaldado (Paltrinieri y Meyer, 1990).

Carne : 500,0 g.
Sorbato de potasio : 1,250 g.
Nitrito de sodio : 0,050 g. *Relación sorbato – nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,312 g . *Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Cloruro de sodio : 21,875 g (3.5 %).
Sacarosa : 6,250 g (1 %).
Polifosfatos : 3,125 g (5000 ppm).
Agua : 92,1 g.

pH : 5,5.
Temperatura : 60 °C.
Tiempo de reacción : 30 min.
Masa total de sistema : 625,0 g.

SISTEMA 18 las condiciones de proceso se acercan a las de un embutido cocido o ahumado (Paltrinieri y Meyer, 1990) y también permite simular un proceso de almacenamiento acelerado.

Carne : 500,0 g.
Sorbato de potasio : 1,250 g.
Nitrito de sodio : 0,050 g. *Relación sorbato – nitrito : 2000 ppm / 80 ppm.*
Acido ascórbico : 0,312 g. *Relación nitrito – ascórbico : 80 ppm / 500 ppm.*
Cloruro de sodio : 21,875 g (3.5 %).
Sacarosa : 6,250 g (1 %).
Polifosfatos : 3,125 g (5000 ppm).
Agua : 92,1 g.

pH : 5,5.
Temperatura : 60 °C.
Tiempo de reacción : 5 hs.
Masa total de sistema : 625,0 g.

SISTEMA 19 : las concentraciones de sorbato y nitrito son las indicadas por las normas del Mercosur para embutidos secos como chorizo, longaniza y salamines (máximo de 200 ppm de sorbato de potasio en la tripa y 150 ppm de nitrito de sodio en el relleno). Este sistema fue modelado suponiendo el caso extremo en el cual todo el sorbato presente inicialmente en la tripa hubiese migrado hacia el interior. La temperatura usada permite sacar conclusiones en base a un ensayo de almacenamiento acelerado.

Carne : 500,0 g.
Sorbato de potasio : 0,125 g.
Nitrito de sodio : 0,094 g. *Relación sorbato - nitrito : 200 ppm / 150 ppm.*
Acido ascórbico : 0,312 g. *Relación nitrito - ascórbico : 150 ppm / 500 ppm.*
Cloruro de sodio : 21,875 g (3.5 %).
Sacarosa : 6,250 g (1 %).
Polifosfatos : 3,125 g (5000 ppm).
Agua : 93,2 g.

pH : 5,5.
Temperatura : 60 °C.
Tiempo de reacción : 5 hs.
Masa total de sistema : 625,0 g.

Técnica de análisis.

El equipo utilizado fue un Perkin Elmer Q - Mass 910 (PINMATE, F.C.E.y N.) con un detector de impacto electrónico de 70 ev, una columna capilar HP - 1 de 25 m de longitud y 0.31 mm de diámetro (metil siloxano) empleando helio como gas carrier y acetato de etilo como solvente de dilución. Las condiciones de corrida para cada una de las sustancias a analizar fueron las siguientes (Cuadro 2 - 2) :

CUADRO 2 - 2. Condiciones de operación para determinación de 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol y ácido etilnitrólico por GC - MS.

<i>1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y)</i>		<i>Acido etilnitrólico (ENA)</i>	
Temperatura inicial	100 °C.	Temperatura inicial	40 °C.
Temperatura final	250 °C.	Temperatura final	250 °C.
Rampa de temperatura	8 °C / min.	Rampa de temperatura	10 °C / min.
Flujo	1,0 ml / min.	Flujo	1,0 ml / min.
Vol. de inyección	1 µl.	Vol. de inyección	1 µl.
Tiempo de retención	10,68 min.	Tiempo de retención	2,18 min.

La presencia de ENA e Y en los sistemas analizados se verificó chequeando la aparición de picos en el cromatograma en los tiempos de retención correspondientes y coinyectando los patrones puros.

TERCERA PARTE

Análisis cuantitativo de ENA en sistemas cárnicos.

El objetivo planteado en esta etapa fue complementar, mediante un estudio cuantitativo del ENA formado, el estudio de la reactividad sorbato - nitrito desarrollado en la etapa anterior.

Los sistemas analizados fueron seleccionados entre los ya descritos en la segunda Parte del trabajo con el fin de estudiar la cantidad de ENA formado bajo distintas condiciones. Las tareas desarrolladas pueden resumirse así :

a) *Cuantificación del ENA sintetizado bajo condiciones ideales para su formación (Sistema 1).*

b) *Cuantificación del ENA formado a partir de un sistema cárnico bajo condiciones similares a un proceso de curado en crudo (Sistema 16).*

c) *Cuantificación del ENA formado a partir de un sistema cárnico bajo condiciones similares a un proceso de escaldado (Sistema 17).*

d) *Cuantificación del ENA formado a partir de un sistema cárnico bajo condiciones similares a un proceso de cocido, ahumado o almacenamiento acelerado (Sistemas 18 y 19).*

La técnica de cuantificación seleccionada en virtud de lo descrito en bibliografía (Osawa y col., 1980; Namiki y col., 1981; Osawa y col., 1986) fue cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Cada sistema fue desarrollado por triplicado y los datos que se informan en el capítulo de Resultados son el promedio de los valores obtenidos. En esta etapa también se evaluó la formación de ENA durante la síntesis ideal con fines comparativos.

Sistema 1 (Síntesis ideal).

De acuerdo a Namiki y col. (1981), estas condiciones son las que determinan una mayor formación de ENA. Previamente al análisis en sí, se analizó la eficiencia de la recuperación de la técnica extractiva usada y descrita en la Segunda Parte de este capítulo. Para ello se diseñó un sistema formado por 0,5 g de ENA disueltos en 150 g de solución acuosa. El mismo sufrió la extracción por triplicado del ENA en las condiciones especificadas anteriormente lo que permitió conocer la eficiencia del proceso de extracción aplicado. La cantidad de ENA utilizada corresponde al tenor que se formaría si se hiciesen reaccionar 10 g de nitrito de sodio

(cantidad presente en el Sistema 1) con ácido sórbico y la proporción formada fuese la establecida por Namiki y col. (1981) que es de 4 mmoles de ENA por cada 120 mmoles de nitrito de sodio. Se obtuvo una recuperación, en medio acuoso, del 91 % p / p.

Sistemas cárnicos (Sist. 16 a 19).

Al igual que en el sistema descrito anteriormente, se realizó en primer lugar un estudio de la recuperación de la técnica, reemplazando sorbato de potasio y nitrito de sodio por 0,0025 g de ENA (que es la cantidad que se formaría a partir de 0,05 g de nitrito según el precitado artículo de Namiki y col.). La recuperación obtenida fue del 68 %.

Técnica de análisis.

La técnica de dosaje usada fue cromatografía líquida de alta resolución. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu C - R4A (Japón) con un inyector Rheodyne 7125, un detector de longitud de onda variable, un integrador Shimadzu C - R4A Chromatopac y una columna ODS Shimadzu de C₁₈ de partículas de 5 µm de diámetro (CITEFA, Ministerio de Defensa). Se utilizó un standard interno (ftalato de dibutilo). Las condiciones de operación se especifican en el Cuadro 2 - 3. Con el fin de resolver adecuadamente los picos correspondientes a cada sistema, se utilizaron diferentes fases móviles.

CUADRO 2 - 3. Condiciones de operación para determinación de ácido etilnitroso por HPLC.

	<i>Sistema 1</i>	<i>Sistemas 16 a 19</i>
Longitud de onda	254 nm.	254 nm.
Fase móvil	agua-metanol 85 : 15 (% v / v).	agua-metanol 25 : 75 (% v / v).
Solvente	agua-metanol 85 : 15 (% v / v).	agua-metanol 25 : 75 (% v / v).
Flujo	1,0 ml / min.	1,0 ml / min.
Volumen de inyección	1 µl.	1 µl.
Velocidad del papel	0,5 cm / min.	0,5 cm / min.
Tiempo de retención	6,36 min.	2,60 min.

El límite de detección de estas técnicas es de 0,5 ppm.

CUARTA PARTE

Análisis cuantitativo de sorbato de potasio en productos cárnicos comerciales argentinos.

El objetivo de esta cuarta y última parte del trabajo realizado fue analizar el contenido de ácido sórbico en productos cárnicos curados de venta común en la Argentina. El Código Alimentario Argentino no autoriza el uso conjunto de sorbatos y nitritos en los productos cárnicos. Existe la propuesta (Mercosur) del uso combinado de los sorbatos en tripa de embutidos cuya masa contiene nitritos. Sin embargo, es importante verificar la presencia de sorbato en productos cárnicos por la posibilidad de su presencia para aumentar la vida útil.

Con este fin, se compraron diversos embutidos y productos cárnicos en supermercados de la Capital Federal. Dichos productos fueron analizados empleando el método de oxidación (A.O.A.C., 1980, secciones 20098 - 20101) modificado por Campos y col. (1991) para homogenatos cárnicos.

Este método 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 el fin de desplazar el equilibrio hacia la forma no disociada del ácido que es volátil y se arrastra con vapor). En la **Figura 2 - 1** se observa un esquema del equipo utilizado.

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

La técnica de medición descripta a continuación presenta algunas modificaciones con respecto a la original (Campos y col., 1991) en la formulación de la curva de calibración, la cual se modela con soluciones estándares más diluidas con el fin de poder interpolar los datos de absorbancia registrados al dosar los productos cárnicos comerciales de interés.

Técnica de dosaje de sorbato.

a) Preparación de reactivos.

- H₂SO₄ : soluciones 2 N y 0,3 N.

- $K_2Cr_2O_7$: se disuelven 1,47 g en agua y se lleva a volumen final de 1000 ml.

- NaOH : solución 0,5 N.

- HCl : solución 0,1 N.

- Sorbato de potasio (solución madre) : se disuelven 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 : se disuelven 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, obteniendo de esta forma una solución de ácido tiobarbitúrico 0,5 % p / v. La solución se debe preparar diariamente. En época de bajas temperaturas, mantener a 20 °C para evitar la precipitación del ácido.

- Arena purificada : se coloca la misma en un vaso de precipitado y se cubre con una solución de ácido clorhídrico al 5 % v / v durante 12 hs, removiéndose frecuentemente con una varilla de vidrio. Luego se desecha el líquido y se lava con agua destilada hasta neutralidad. Finalmente se coloca la arena en capas delgadas, en una estufa de 160 °C durante no menos de 5 hs. Transcurrido dicho tiempo, se envasa en caliente en un recipiente hermético.

b) Extracción del ácido sórbico.

Se pesan entre 1,5 y 2,5 g de muestra y se colocan en el portamuestra (ver Figura 2 - 1), luego se adiciona entre 5,0 y 7,5 g de arena purificada y 10,0 g de sulfato de magnesio heptahidratado. Con la ayuda de una varilla de vidrio se disgrega mecánicamente la muestra. Se adicionan luego 10,0 ml de una solución de ácido sulfúrico 2 N y unas gotas de antiespumante (A - P 20, Darmex, Argentina). El portamuestra se coloca en el equipo esquematizado en la Figura 2 - 1 para realizar la destilación por arrastre con vapor. Se recogen alrededor de 150 ml de destilado.

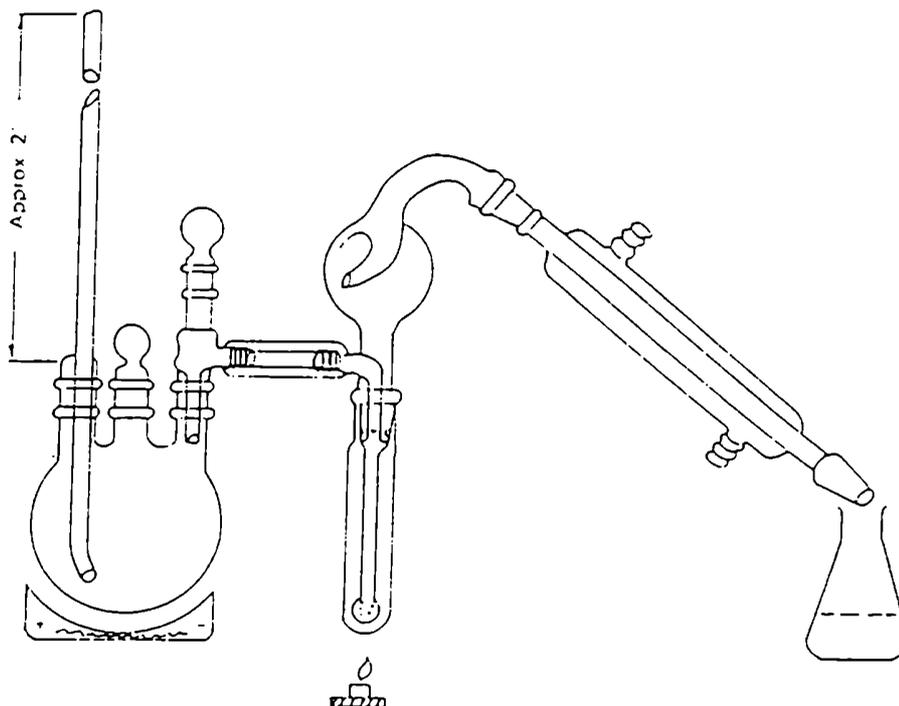
En base a las indicaciones mencionadas por la A.O.A.C., sección 20101, se deben tomar las siguientes precauciones :

- ◆ Evitar durante la destilación que el volumen de líquido supere el 50 % del volumen total del portamuestra.
- ◆ Evitar carbonización de la muestra durante la operación de destilación.

Ambas situaciones se controlan regulando la entrada de gas al mechero colocado debajo del

portamuestra (ver Figura 2 - 1).

Figura 2 - 1. Esquema del equipo utilizado para la extracción del ácido sórbico mediante destilación por arrastre con vapor (A.O.A.C., 1980).



c) Oxidación y medición espectrofotométrica.

Una alícuota de 2,0 ml de destilado se coloca en un tubo de ensayo al que se adiciona 1,0 ml de solución 0,3 N de ácido sulfúrico y 1,0 ml de solución de $K_2Cr_2O_7$. Se calienta 5 minutos en baño de agua a ebullición. Se pasa el tubo inmediatamente a un baño de hielo y se le adicionan 2,0 ml 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 (Spekol Zeiss, Alemania) contra un blanco de reactivos. La concentración de sorbato de potasio se calcula interpolando la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

Paralelamente al análisis de cada producto, se realiza un blanco sin dicromato con el fin de detectar la posible presencia de interferentes los cuales podrían originar falsos positivos. En todos los casos, las absorbancias medidas fueron negativas o cero lo cual garantiza la ausencia de interferentes y la viabilidad de la técnica.

d) Curva de calibración.

Para la preparación de los estándares se toman respectivamente 0,05; 0,1; 0,3; 0,7 y 1,0 ml de solución madre de sorbato de potasio y se lleva a volumen con agua destilada en matraces de 100 ml. De esta forma, se obtienen soluciones estándares de 0,05; 0,1; 0,3; 0,7 y 1,0 ppm de ácido sórbico. 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 es la siguiente :

<i>Concentración de ácido sórbico (ppm)</i>	<i>Absorbancia a 532 nm.</i>
0,05	0,0196
0,10	0,0372
0,30	0,0695
0,70	0,1683
1,00	0,2381

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

Productos analizados.

Los productos analizados fueron seleccionados con la intención de barrer el mayor espectro posible de métodos de preservación los cuales, combinados con el agregado de nitrito, aseguran la estabilidad microbiológica del producto. Asimismo, fueron analizados algunas "tripas" que suelen envolverlos. El análisis se realizó por sextuplicado. En el capítulo de Resultados se informan los valores obtenidos junto con su intervalo de confianza correspondiente (a un nivel de confianza de 0,95). A continuación, se mencionan los productos analizados junto a sus correspondientes técnicas de preservación y manufactura.

Jamón cocido (curado, escaldado, pasteurizado).

Hamburguesa (carne cruda).

Salchicha tipo Viena (escaldado, curado).

Corned Beef (curado, esterilizado).

Longaniza (crudo curado).

Chorizo Tipo Candelario (crudo curado).

Salame Tipo Holstein (crudo curado, ahumado).

Tripa del salame Tipo Holstein.

Salame alemán kosher Tipo Wurzt (curado, escaldado, ahumado).

Tripa del salame alemán kosher Tipo Wurzt.

Capítulo Tercero

RESULTADOS

De acuerdo a lo explicitado en el capítulo de Materiales y Métodos, los resultados obtenidos pueden agruparse en cuatro partes :

Primera parte. Caracterización del 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y) y del ácido etilnitróico (ENA), obtenidos bajo condiciones controladas de acuerdo a lo descripto en el capítulo de Materiales y Métodos empleando espectrometría de masa (MS), resonancia magnética nuclear (NMR) y espectroscopía infrarroja (IR).

Segunda parte. Análisis de la presencia de los precitados productos en sistemas modelo acuosos conteniendo medios de cultivo y aditivos y en sistemas cárnicos, empleando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC - MS).

Tercera parte. Análisis cuantitativo de ENA en los sistemas cárnicos descriptos en el capítulo de Materiales y Métodos, empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuarta parte. Análisis cuantitativo del sorbato de potasio presente en productos cárnicos comerciales de la Argentina.

PRIMERA PARTE

Caracterización del 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y) y del ácido etilnitrólico (ENA) obtenidos por síntesis.

1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y).

A partir de la obtención de un patrón puro de esta sustancia de acuerdo a la descrito en el capítulo de Materiales y Métodos y con la finalidad de caracterizar su estructura y evaluar su pureza, se efectuaron los siguientes análisis estructurales :

MS (espectrometría de masa) : el espectro de masa de Y se observa en la **Figura 3 - 1**. Se destacan, entre otros, los siguientes picos :

171 : corresponde al ión molecular.

39 : pico base, corresponde a un ión ciclopropenil, lo cual es muy común en estructuras tipo pirroles.

30 : NO^- .

Estas conclusiones coinciden con lo publicado por Kito y col. (1978) y Gerschenson (1991).

NMR (resonancia magnética nuclear) : el espectro de NMR ^1H se observa en la **Figura 3 - 2**. Se distinguen claramente las señales a $\delta = 8,87$ (s); $7,89$ (s) y $2,64$ (s) ppm. Estas señales corresponden a los hidrógenos en las posiciones 5, 3 y metílicos respectivamente. Por otra parte, el espectro de NMR ^{13}C se observa en la **Figura 3 - 3**. Se destacan picos a $\delta = 141$ (s), 113 (s), 136 (s), 124 (s) y 19 (s) ppm que corresponden a las señales provenientes de los carbonos en las posiciones 2, 3, 4, 5 y metílico respectivamente. Estas señales coinciden con las informadas en bibliografía (Kito y col., 1978).

Acido etilnitrólico (ENA).

A partir de la obtención de un patrón puro de esta sustancia de acuerdo a la descrito en el capítulo de Materiales y Métodos y con la finalidad de caracterizar su estructura y evaluar su pureza, se efectuaron los siguientes análisis estructurales :

MS (espectrometría de masa) : el espectro de masa del ENA se observa en la **Figura 3 - 4**. Se destacan, entre otros, los siguientes picos :

58 (M - 46) : que corresponde a la pérdida de un grupo nitro (pico base).

46 : NO_2^- .

31 : NOH^- .

30 : NO^- .

Se distinguen picos de masa superior al ión molecular (el cual es de 104), lo cual señala la presencia de reacciones en el horno del equipo. Particularmente, la presencia de un pico de 209 parece indicar la formación de un dímero.

NMR (resonancia magnética nuclear) : el espectro de NMR ^1H se observa en la **Figura 3 - 5**. Presenta un singulete a $\delta = 2,5$ ppm (3 H) y otro a $\delta = 9,8$ ppm (1 H), que corresponden a los protones metílicos y del OH respectivamente. El espectro de RMN de ^{13}C presenta a su vez dos señales singuletes (ver **Figura 3 - 6**) : a 11 ppm (carbono metílico) y a 162 ppm (carbono unido a los grupos nitro y NOH). Estos datos coinciden con lo reportado por Namiki y Kada (1975).

IR (espectroscopía infrarroja) : el espectro infrarrojo del ENA se observa en la **Figura 3 - 7**. Presenta bandas típicas a 3300 cm^{-1} (estiramiento O-H), $1564,9\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento N-O asimétrico correspondiente a un grupo nitro alifático), $1387,2\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento N-O simétrico correspondiente a un grupo nitro alifático) y bandas a 1354, 1183, 854 y 735 cm^{-1} correspondientes a alargamientos C-O, C-N y C-H. Estas bandas resultan muy semejantes a las mencionadas en bibliografía (Morgan, 1959; Namiki y Kada, 1975).

FIGURA 3 - 1. Espectro de masa de 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y).

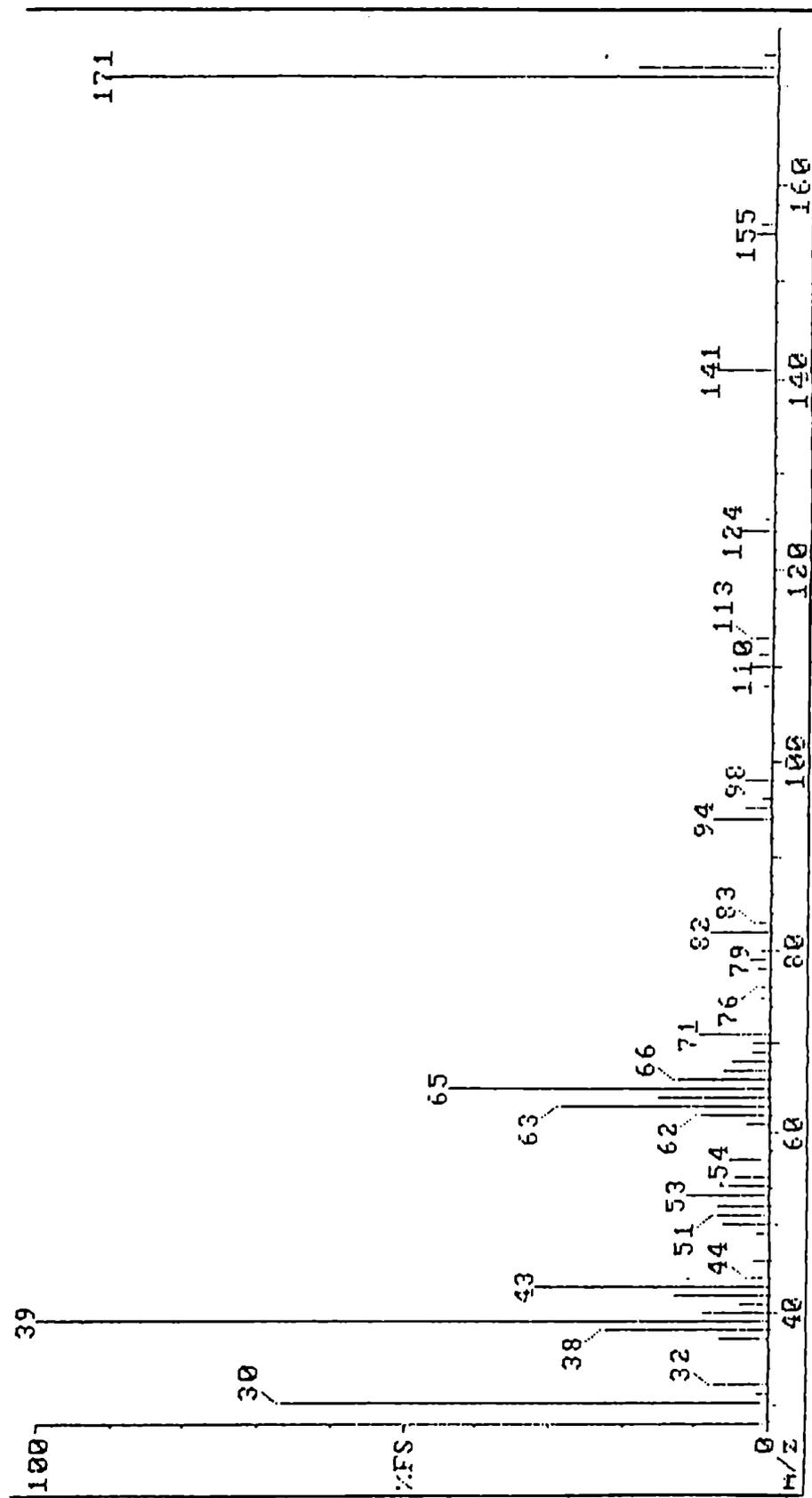
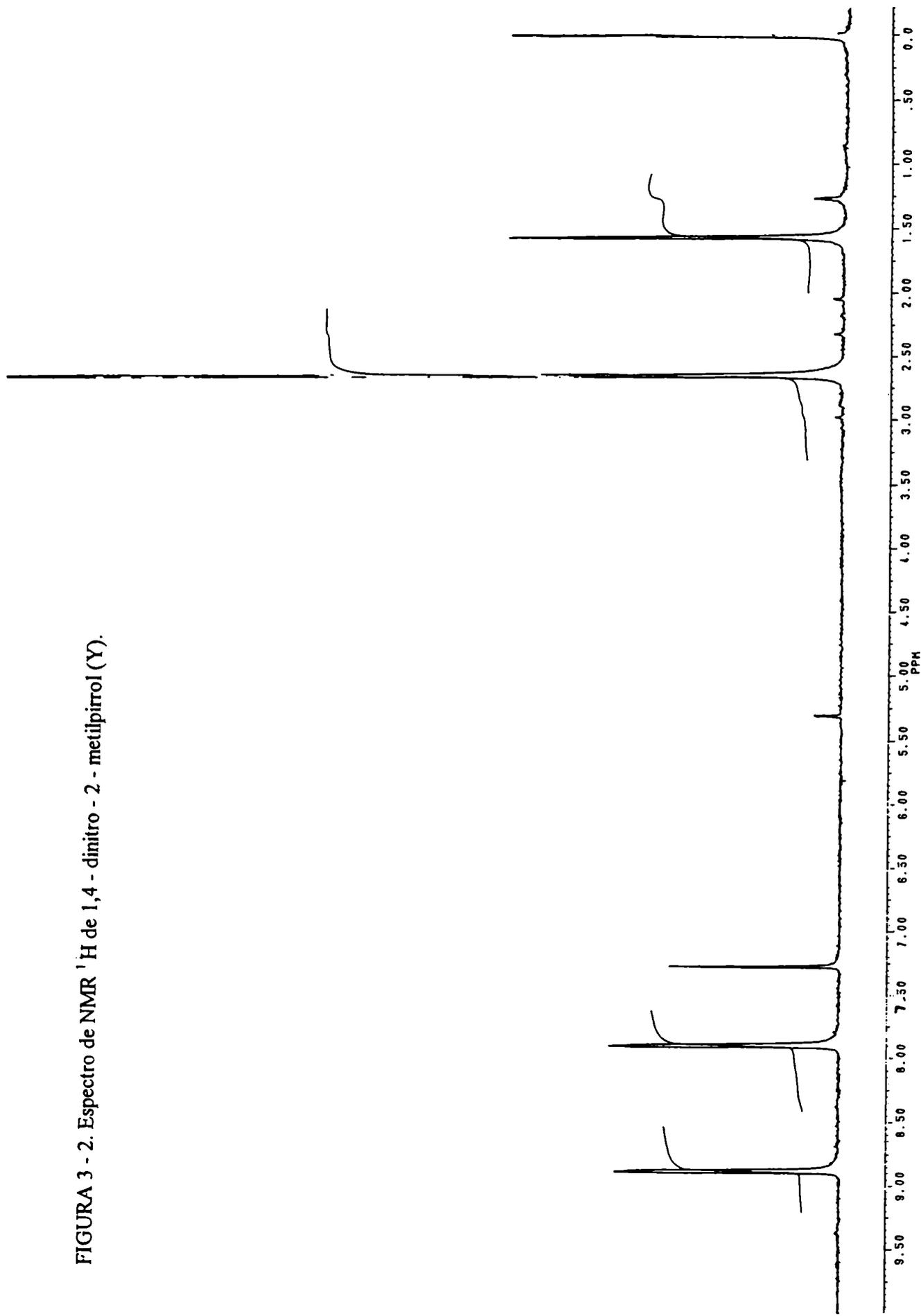


FIGURA 3 - 2. Espectro de NMR ^1H de 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y).



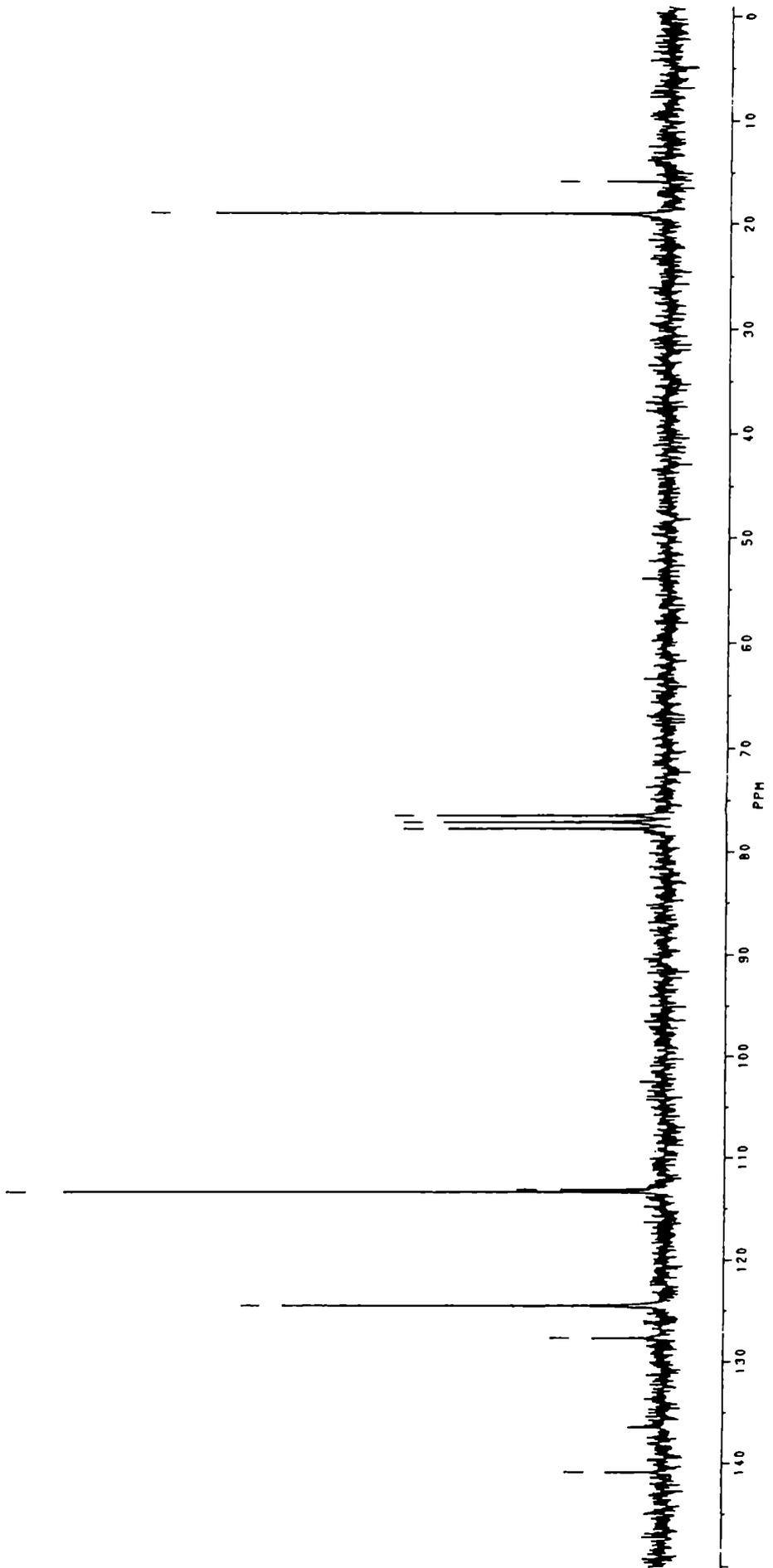
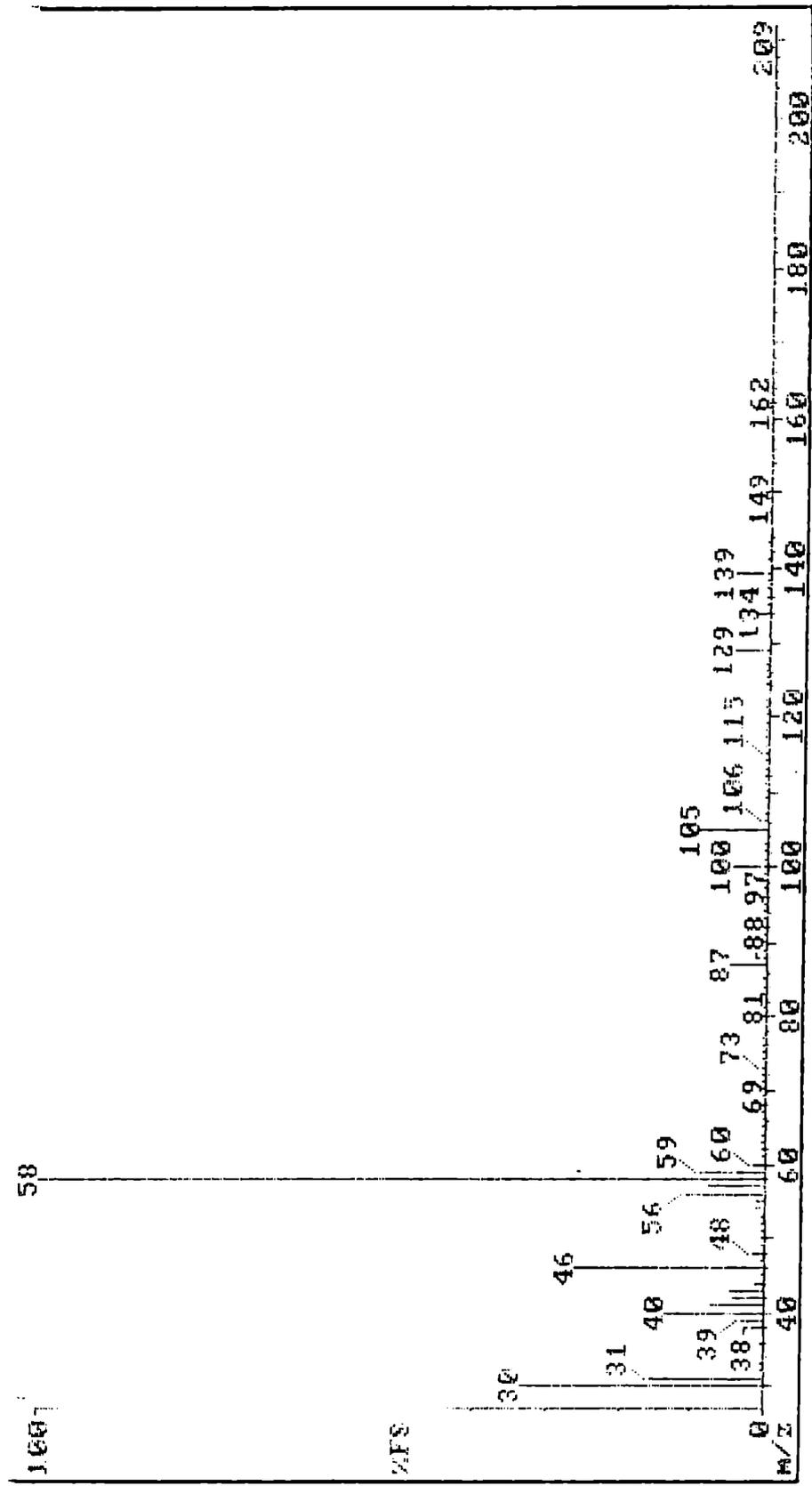
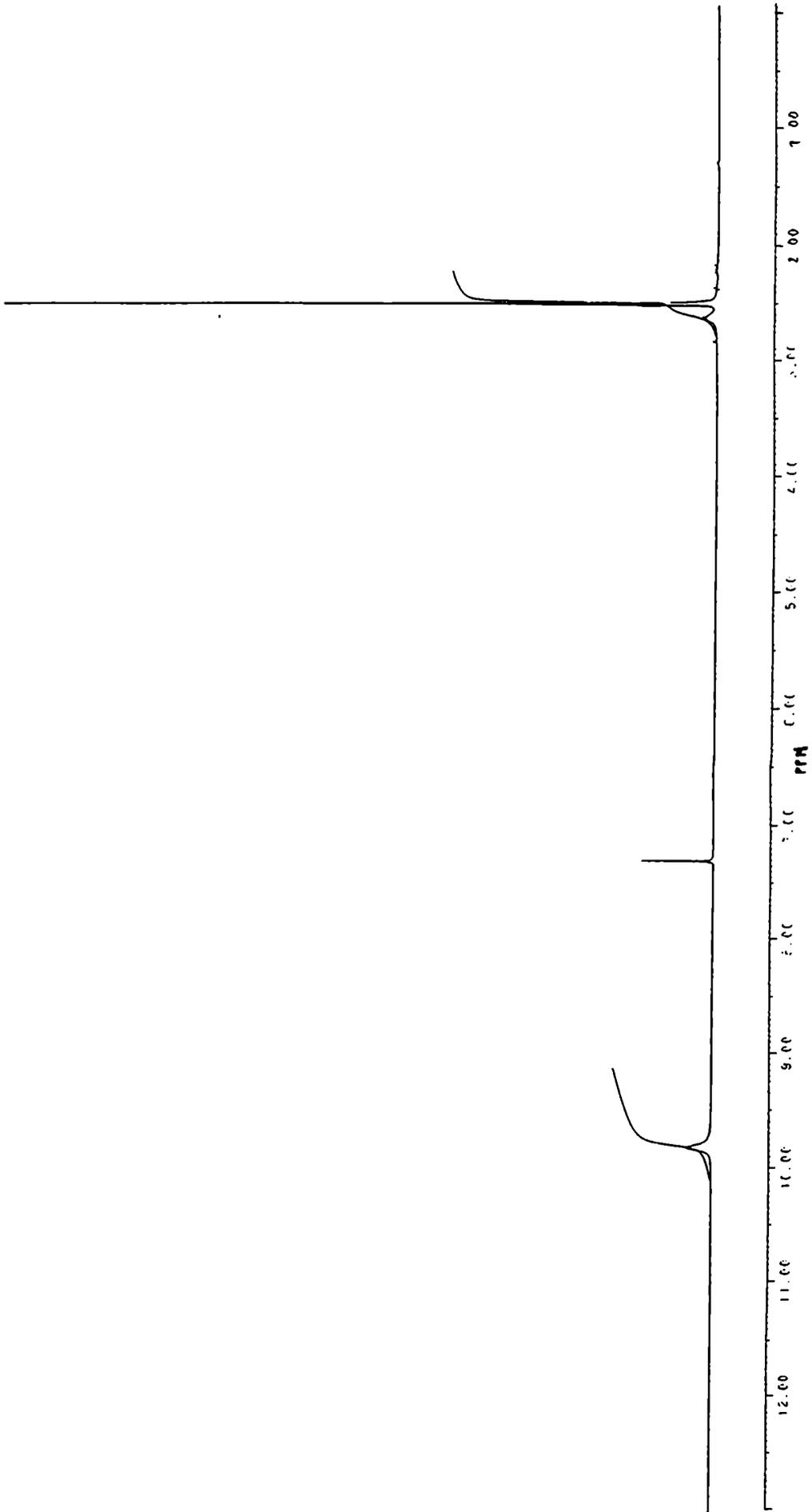


FIGURA 3 - 4. Espectro de masa de ácido etilnitroso (ENA).





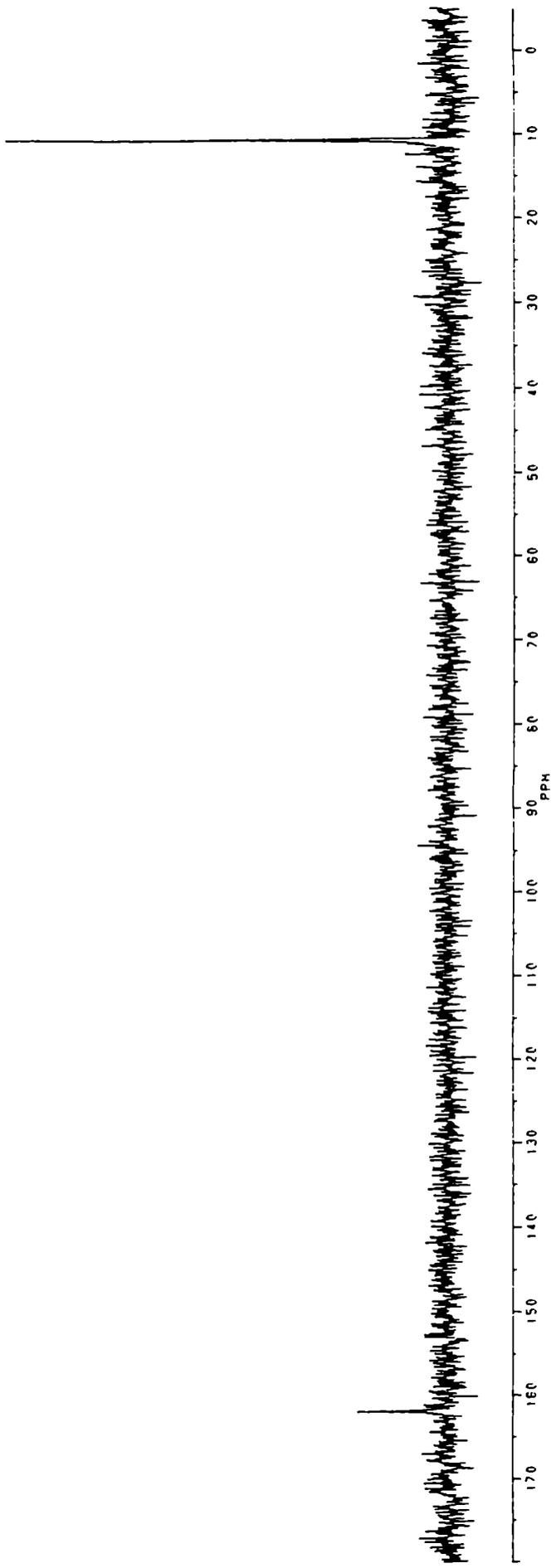
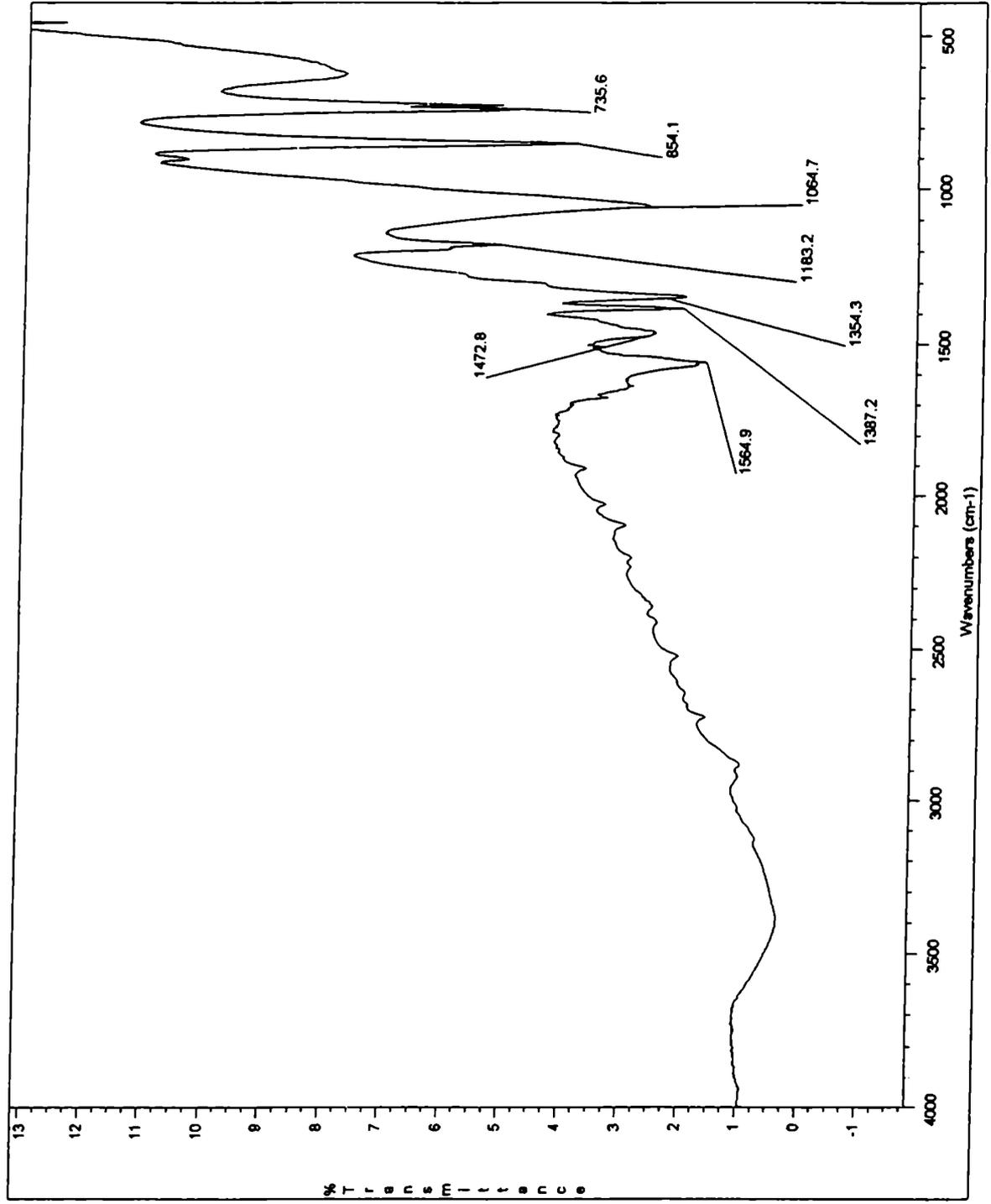


FIGURA 3 - 7. Espectro infrarrojo de ácido etilnitroso (ENA).



SEGUNDA PARTE

Análisis de la presencia de ENA e Y en sistemas modelo acuosos y en homogenatos cárnicos.

En esta etapa del trabajo realizado se analizó la presencia de 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y) y ácido etilnitrólico (ENA) en los sistemas modelados de acuerdo a lo explicitado en la Segunda Parte del capítulo de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos, para su mejor visualización, se agrupan en el siguiente cuadro.

CUADRO 3 - 1. Presencia o ausencia de 1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y) y ácido etilnitrólico (ENA) en los sistemas estudiados.

<i>Sistemas analizados</i>	<i>1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y)</i>	<i>Acido etilnitrólico (ENA)</i>
Sistemas acuosos sin ácido ascórbico o cisteína (Sist. 1 y 2)	Presencia	Presencia.
Sistemas acuosos con ácido ascórbico o cisteína (Sist. 3 a 15)	Ausencia	Presencia.
Sistemas cárnicos (Sist. 16 a 19)	Ausencia	Presencia.

TERCERA PARTE

Análisis cuantitativo de ENA en sistemas cárnicos

En esta etapa del trabajo se estudió en forma cuantitativa mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la presencia de ácido etilnitroso (ENA) en vista de los resultados obtenidos en la etapa inmediata anterior del trabajo. Este estudio cuantitativo se efectuó sobre los sistemas 1, 16, 17, 18 y 19 de acuerdo a lo explicitado en la tercera parte del capítulo de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos, para su mejor visualización, se agrupan en el **Cuadro 3 - 2**. Para analizar las diferencias significativas de los datos, se realizó un análisis de varianza aplicándose un test Tukey (Sokal y Rohlf, 1980).

A modo de ejemplo, se puede observar en la **Figura 3 – 8** el cromatograma del sistema 17 en el cual se observa el pico correspondiente al ácido etilnitroso alrededor de los 2,60 minutos, de acuerdo a lo reportado en Materiales y Métodos.

Cuadro 3 - 2. Dosaje de ácido etilnitrólico (ENA) en sistemas estudiados.

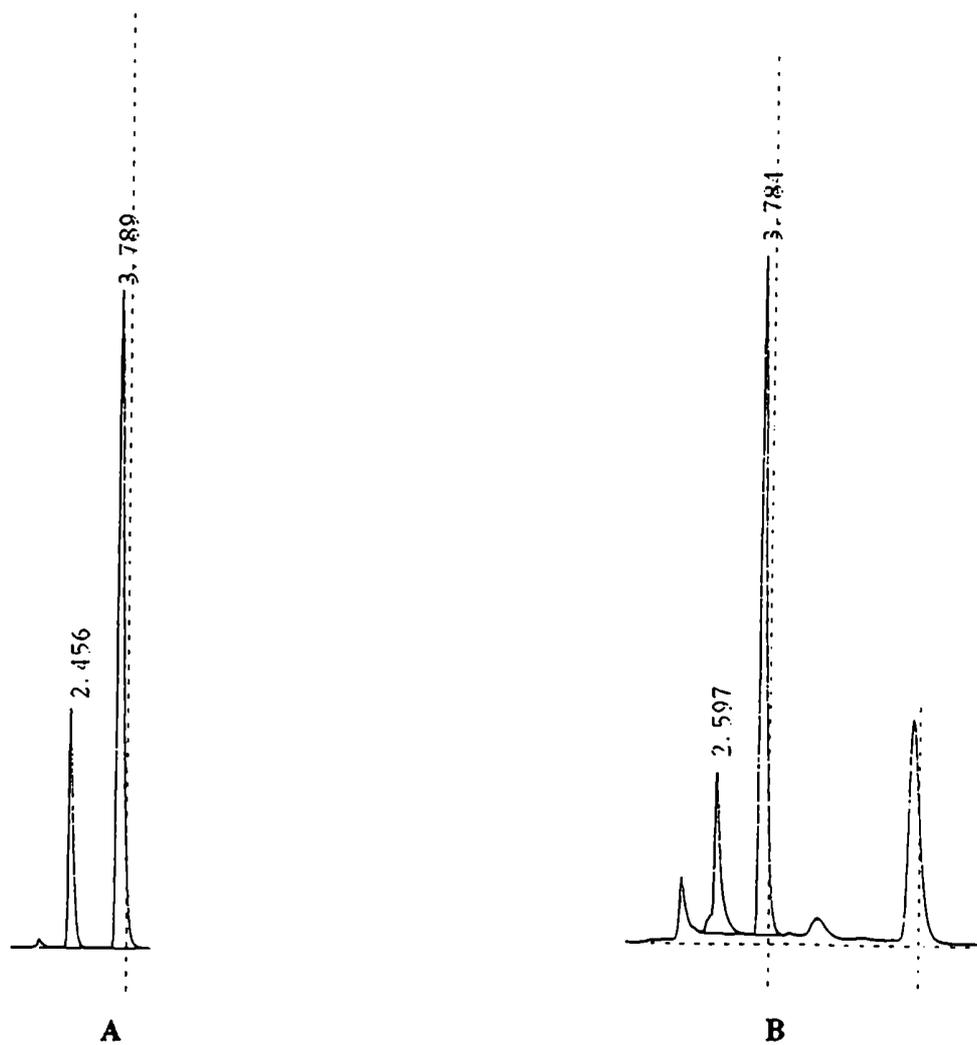
<i>Sistemas analizados</i>	<i>concentración de ENA (ppm)</i>
1 * (síntesis ideal, relación molar sorbato / nitrito 8 : 1 con 66667 ppm de nitrito de sodio y 13333 ppm de sorbato de potasio)	81 ± 23.
16 (sistema cárnico curado en crudo con relación sorbato / nitrito 2000 : 80 ppm)	3 ± 1.
17 (sistema cárnico escaldado con relación sorbato / nitrito 2000 : 80 ppm)	6 ± 2 a,b.
18 (sistema cárnico cocido con relación sorbato / nitrito 2000 : 80 ppm)	8 ± 3 a,c.
19 (sistema cárnico cocido con relación sorbato / nitrito 200 : 150 ppm)	5 ± 1 b,c.

* Con fines comparativos, se reporta la síntesis ideal de ENA según lo reportado por Namiki y col. (1981).

Los valores de ácido etilnitrólico se informan junto al correspondiente intervalo de confianza (nivel de confianza : 0.95).

Los datos seguidos por igual letra no presentan diferencias significativas.

FIGURA 3 - 8. Cromatogramas (HPLC) de ácido etilnitrólico (ENA).



A) Resolución de una mezcla de ácido etilnitrólico (estándar, tiempo de retención : 2,456 min.) y ftalato de dibutilo (estándar, tiempo de retención : 3,789 min.)

B) Cromatograma del sistema 17, mostrando los picos de ENA (2,597 min.) y ftalato de dibutilo (3,784 min., estándar interno)

CUARTA PARTE

Análisis cuantitativo de sorbato de potasio en productos cárnicos comerciales argentinos.

Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo pueden observarse en el siguiente cuadro.

Cuadro 3 - 3. Contenido de ácido sórbico en embutidos comerciales en Argentina.

<i>Producto</i>	<i>Concentración de ácido sórbico (ppm)</i>
Salchichas Tipo Viena	35 ± 5.
Hamburguesas	17 ± 4.
Jamón cocido	24 ± 4.
Corned beef	13 ± 3.
Longaniza	38 ± 5.
Chorizo	32 ± 3.
Salame tipo Holstein	54 ± 6.
Tripa del Salame tipo Holstein	49 ± 5.
Salame alemán tipo Wurzt (kosher)	6 ± 2.
Tripa del salame alemán tipo Wurzt (kosher)	6 ± 1.

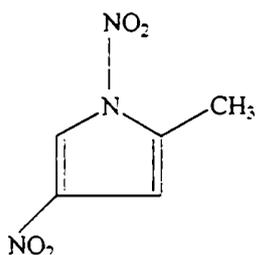
Los valores de ácido sórbico se informan junto al correspondiente intervalo de confianza (nivel de confianza : 0.95).

Capítulo Cuarto

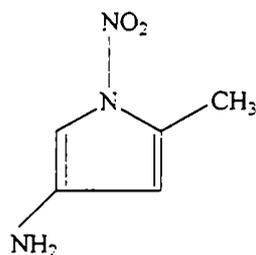
DISCUSION

La obtención de patrones purificados de ENA e Y resulta imprescindible a la hora de definir con certeza la presencia o no de sustancias mutagénicas en los sistemas en estudio. La caracterización de dichos compuestos permitió corroborar la eficacia de las síntesis realizadas y asegurar el contar con los patrones adecuados.

De los resultados obtenidos, uno de los aspectos que resalta con mayor nitidez es la presencia de ENA y la ausencia de Y en los sistemas que contienen ácido ascórbico o cisteína (Cuadro 3 - 1). En los trabajos de Osawa y col. (1980, 1986), se menciona que el ácido ascórbico es capaz de anular la acción mutagénica debido a su poder de transformar el grupo nitro de la posición 4 del Y en un grupo amino.



1,4 - dinitro - 2 - metilpirrol (Y)



1 - nitro - 2 - metil - 4 - aminopirrol

En el caso del tratamiento con cisteína, se sugiere que se origina un aducto de Y con el aminoácido, el cual anula la acción mutagénica.

Distintos investigadores (Mirvish y col., 1972; Guttenplan, 1977; Gray y Randall, 1979; Kyrtopoulos, 1987) sostienen que la reacción nitrito - ascórbico es muy veloz, bloqueando al nitrito en cuanto a su participación en otras reacciones. Ello podría también aplicarse a las reacciones en estudio, justificando la no formación del compuesto Y en presencia de ácido ascórbico si la reacción correspondiente fuese más lenta que aquella.

Namiki y col. (1981) determinaron que la mínima concentración de ácido ascórbico necesaria para inhibir la formación de ENA e Y era de 10 mM para ENA y 5 mM para Y cuando ambos productos provenían de una reacción entre una solución 20 mM de ácido sórbico y otra 20 mM de nitrito de sodio. En idénticas condiciones, fueron necesarias concentraciones molares equivalentes de cisteína y nitrito de sodio para una completa

inhibición de la formación de compuestos mutagénicos. Los trabajos de Osawa y col. (1980, 1986) presuponen, ignorando antecedentes bibliográficos (Namiki y col., 1981) que la acción mutagénica observada cuando coexisten sorbato y nitritos se debe, exclusivamente, a la presencia del compuesto Y. Las condiciones que ellos sugieren para la destrucción de Y, una vez formado, es su reacción con ácido ascórbico o cisteína en una relación de 8 moles del reductor a 1 de Y, cuando el pH es de 6.8. Estos investigadores no estudiaron la situación, más real, de coexistencia de estos reductores con sorbato y nitrito, ya sea en una sal de cura o en un producto cárnico.

Robach y col. (1980, a) afirmaron que en sistemas sorbato - nitrito - ascorbato conteniendo 2600 ppm de sorbato, 40 ppm de nitrito, 550 ppm de ascorbato y con un pH que varía entre 5,0 y 7,2, no se produce formación de Y o ENA a lo largo de 5 horas de calentamiento a 55 °C. Por lo tanto, no existiría riesgo de mutagenicidad. Esta investigación llega a la conclusión que el ENA no se forma, a niveles de nitrito menores que 250 ppm aún en ausencia de ácido ascórbico y que el ENA resulta inestable a temperaturas de cocción. Osawa y col. (1986) afirman que el compuesto Y es completamente eliminado cuando reacciona con ocho veces su cantidad molar de ácido ascórbico o cisteína. En cambio, ellos encuentran que el ácido etilnitroso no es afectado por el ácido ascórbico pero sí es parcialmente destruido cuando reacciona con cuatro veces su cantidad molar de cisteína, siendo la destrucción de un 75 % cuando la relación molar ENA : cisteína es de 1 / 16. Namiki y col. (1980) establecieron que una relación molar nitrito : ascórbico o cisteína de 1 : 1 evitan la formación de Y o ENA.

De acuerdo a estos antecedentes bibliográficos tan diversos, en nuestro trabajo decidimos evaluar la influencia en la formación de ENA e Y en sistemas acuosos, de la presencia de ascórbico y cisteína en relaciones molares nitrito : ascórbico de 1 : 8 (Sistema 4) y nitrito : cisteína de 1 : 8 (Sistema 5) y 1 : 16 (Sistemas 6 y 9). También se evaluó la influencia de la presencia de ácido ascórbico en relación molar nitrito : ascórbico de 80 ppm / 500 ppm (Sistemas 3, 8, 10 a 15). El ensayo se extendió a sistemas cárnicos conteniendo la última proporción citada de ácido ascórbico (Sistemas 16 a 18) y una proporción nitrito : ascórbico de 150 ppm : 500 ppm (Sistema 19). Nuestro trabajo permite afirmar que se forma ENA y no se produce formación de Y a pH 5,0 ó 5,5, cuando se usan relaciones sorbato de potasio : nitrito de sodio : ácido ascórbico de 2000 ppm : 80 ppm : 500 ppm (relación molar nitrito / ascórbico de 1 : 3) ó 2000 ppm : 80 ppm : 1633 ppm (relación molar nitrito / ascórbico de 1 : 8) en sistemas acuosos y cárnicos siendo la temperatura del ensayo de 35 °C ó 60 °C y los tiempos de tratamiento de 5 horas ó 30 minutos / 5 horas respectivamente (Sistemas 3, 4, 8, 10 a 18, Cuadro 3 - 1). Asimismo, cuando la relación sorbato - nitrito es de 200 ppm : 150 ppm y se encuentran presentes 500 ppm de ácido ascórbico en el sistema cárnico, la tendencia observada es la misma, siendo el tratamiento de 5 hs a 60 °C (Sistema 19). En cuanto al efecto de la cisteína (Sistemas 5, 6 y 9) nosotros pudimos comprobar, como ya se dijo antes, que tanto una relación molar de cisteína a nitrito de 8 : 1 como una de 16 : 1 únicamente inhiben la formación de Y ya que el ENA se continuaba detectando por GC - MS (Cuadro 3 - 1).

Es de destacar que la presencia de caldo cerebro corazón y extracto de levadura (Sistemas 7 a 9) no altera la tendencia observada en cuanto a que el ácido ascórbico (Sistema 8) y la cisteína (Sistema 9) únicamente evitan la formación de Y pero no de ENA. El agregado

calculando el ENA formado en relación a la cantidad de nitrito en condiciones de reaccionar en base a los datos del Cuadro 3 - 2, se llega a los resultados que se pueden observar en el Cuadro 4 - 1.

Cuadro 4 - 1. Formación de ENA en distintos sistemas cárnicos.

Sistema	pH	Relación molar SK / NaNO ₂	Relación en ppm SK / NaNO ₂	Condiciones de temperatura / tiempo	Relación en ppm ENA / NaNO ₂
1	3,5	1 : 8	13333 / 66667	60 °C, 30 min.	0,005
16	5,5	13 : 1	2000 : 80	35 °C, 5 hs.	0,025
17	5,5	13 : 1	2000 : 80	60 °C, 30 min.	0,075
18	5,0	13 : 1	2000 : 80	60 °C, 5 hs.	0,100
19	5,5	3 : 1	200 : 150	60 °C, 5 hs.	0,027

SK : sorbato de potasio

Respecto de este último cuadro, es posible concluir lo siguiente :

i) La síntesis propuesta por Namiki y col. (1981) y llevada a cabo en el sistema 1 muestra, en general, menor formación de ENA por unidad de masa de nitrito que los otros sistemas. Debemos destacar que la masa de ENA formada por unidad de masa de nitrito (0,005) en el sistema 1 ha sido sensiblemente inferior a la reportada por Namiki y col. en 1981 (0,011 – 0,038) aunque todas las condiciones han sido idénticas. De cualquier modo, aún la relación reportada por los precitados investigadores es inferior a la observada en los sistemas 17 y 18.

ii) Al aumentar la temperatura, aumenta la relación ENA / NaNO₂ (Sistemas 16 y 18). Robach y col. (1980, a) reportaron que el ENA es muy lábil al calor y se descompone, en menos de un segundo, a 170 °C (temperatura de cocción del tocino) y que a 100, 70, 55 y 43 °C, los tiempos requeridos para descomposición completa son 19 seg., 11,5 min., 2,0 hs. y 17,5 hs. respectivamente. Sin embargo, los resultados exhibidos en el Cuadro 4 - 1 muestran una significativamente mayor producción de ENA a 60 °C que a 35 °C. Pareciera prevalecer el efecto acelerador de la temperatura sobre la velocidad de reacción frente al efecto exaltador de la descomposición del producto.

iii) Al aumentar el tiempo de tratamiento, aumenta significativamente la relación ENA / NO₂Na (Sistemas 17 y 18).

iv) Cuando las demás condiciones permanecen constantes, una disminución de la relación molar o másica sorbato / nitrito (Sistema 19 frente al 18) produce una disminución de la formación de ENA. Existen firmes evidencias de que el nitrito es capaz de reaccionar con compuestos carbonílicos generados por reacciones químicas en alimentos como es el caso del malonaldehído (Kolodziejska y col., 1990), compuestos con dobles ligaduras como el ácido oleico (Mouloud y col., 1992), ácido ascórbico (Mirvish y col., 1972; Kyrtopoulos, 1987) y, por supuesto, con aminas produciendo las ya mencionadas nitrosaminas (Lijinsky y Epstein, 1970; Mirvish, 1970; Mirvish, 1971; Fazio y col., 1971; Sebranek y Cassens, 1973; Crosby y Sawyer, 1976; Bharucha y col., 1979). Si la reacción entre ácido sórbico y nitrito de sodio para dar ENA fuese de menor orden (respecto al nitrito) que alguna otra reacción que consume nitrito, podría ocurrir que un aumento de la concentración de nitrito desfavoreciese la formación de ENA privilegiando algunas de las reacciones precitadas.

Respecto a las conclusiones iii) y iv), debemos remarcar que, en el caso de los sistemas 17, 18 y 19, las diferencias observadas en concentración de ENA obtenido (Cuadro 3 - 2) no resultaron significativas al nivel de probabilidad del 95 % por lo que los datos reportados en el Cuadro 4 - 1 sólo marcan tendencias.

Hartman (1983) informó que los productos mutagénicos ENA e Y pueden formarse cuando el nitrito y el sorbato se encuentran en relación molar de 2 a 1 y que la actividad genotóxica puede ser detectada hasta relaciones molares nitrito : sorbato de 0,2 a 1. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que aún a relaciones molares tan bajas como 0,08 a 1 (correspondiente a una relación nitrito : sorbato de 80 ppm a 2000 ppm), se forma ácido etilnitroso. No existen datos en bibliografía referentes a la mínima concentración de ENA necesaria para producir mutagenicidad *in vitro*. Si bien las cantidades de ENA formadas en nuestros ensayos es pequeña, es preocupante su presencia en todos los sistemas cárnicos modelados en distintas condiciones teniendo en cuenta sus propiedades tóxicas (Namiki y col., 1981; Rehse y col., 1986; Sofos, 1989) así como la influencia de la temperatura y el tiempo de tratamiento en su formación.

Como ya fue mencionado en el capítulo de Introducción del presente trabajo, la inmersión de tripas en soluciones de sorbato para inhibir el crecimiento de mohos en la superficie es una práctica habitual en la tecnología de embutidos y está en proceso de ser autorizada por las normas nacionales (Código Alimentario Argentino) e internacionales (Mercosur). La Unión Europea (U.E.) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A.) ya aplican esta práctica. A modo de ejemplo, podemos decir que las normas de la Unión Europea permiten un máximo de 2 mg / dm² de ácido sórbico en tripas. La difusión del sorbato ha sido analizada por distintos investigadores (Guilbert y col., 1985; Giannakopoulos y Guilbert, 1986, a y b). Del resultado de sus trabajos, se conoce el comportamiento difusional del ácido sórbico en geles y algunos alimentos. En base a ello, se podría estimar la difusividad del preservador desde la tripa a la masa de los embutidos o, de modo más general, de la superficie al interior de los productos cárnicos. Esta difusión determinaría el encuentro de los sorbatos con los nitritos presentes en productos cárnicos curados, permitiendo la formación de ácido etilnitroso, de acuerdo a lo ya visto.

Suponiendo que :

- i) la concentración (C) en la tripa variase linealmente con el tiempo (t), se podría decir que :

$$C = kt \quad (1)$$

con, k : constante cinética con unidades de concentración por unidad de tiempo.

- ii) la concentración inicial en la tripa (C_0) fuese de 200 ppm, de acuerdo a la propuesta de la norma Mercosur - Código Alimentario Argentino.

- iii) la concentración en la tripa a los 30 días (C_{30}) fuese $C_{30} = C_0 / 2$.

- iv) el producto cárnico en cuestión pudiese asimilarse en su forma a un cilindro de diámetro (D) de 3 cm.

- v) el producto considerado se comportase, a los fines de la difusión, como una matriz homogénea en la cual el sorbato presentase una difusividad aparente es de $0,1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{seg}$ (a 25°C). De acuerdo a los valores reportados por Giannakopoulos y Guilbert (1986, b), éste es uno de los más bajos valores de difusividad de los sorbatos en matrices alimenticias y, por lo tanto, permitirá hacer un cálculo conservador.

Entonces, con dichas suposiciones, se puede calcular el valor de k a partir de la ecuación (1), resultando $k = 3,33 \text{ ppm} / \text{día}$.

Con este dato, se puede calcular C_{30} en el borde del producto cárnico ($r = R$), en el centro ($r = 0$) y en un punto intermedio ($r = 0,5 R$), considerando difusión en estado no estacionario y concentración en la superficie variable en forma lineal con el tiempo (Crank, 1956). Se obtienen así concentraciones de sorbato de 104 ppm para el borde, 0 ppm para el centro y 26 ppm para $r = 0,5 R$. Ello avala la suposición iii) y permite confirmar los cálculos realizados. Debemos destacar que la cinética de oxidación del sorbato es lenta en las condiciones propias de un producto cárnico, siendo la destrucción menor al 20 % a lo largo de 30 días (Gerschenson y Campos, 1995). Por lo tanto, las concentraciones calculadas en base al mecanismo difusivo no se verán muy afectadas en los tiempos considerados.

Por lo tanto, podemos afirmar que, teniendo en cuenta que las normas propuestas para el Mercosur autorizan usar 200 ppm de sorbato de potasio en tripas de embutidos, más del 50 % de esta cantidad podría migrar hacia el interior del alimento en un período de almacenamiento de un mes, a temperatura ambiente. Ello le permitiría reaccionar con el nitrito para formar ácido etilnitroso, con el consiguiente riesgo para la salud.

Puede decirse, además, que el sorbato detectado en los productos cárnicos analizados y reportado en el Cuadro 3 - 3 podría entonces haber difundido desde la tripa o superficie hacia

el interior, en el caso de los embutidos, por ejemplo. Es interesante ver que en el caso del salame Tipo Holstein o del salame kosher Wurzt, la concentración en tripa y en masa del embutido es, prácticamente, la misma, lo que apoyaría la suposición acerca de la difusión mostrando un equilibrio alcanzado. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad del agregado directo a la masa, al observar en el Cuadro 3 - 3 que productos como hamburguesas o Corned Beef también muestran presencia de sorbatos, sobre todo existiendo reportes sobre la presencia de nitrito, otro aditivo no autorizado, en hamburguesas, en el mercado argentino (Martínez, 1991). Probablemente, en estos casos los aditivos se agreguen con la finalidad de aumentar la vida útil del producto y / o corregir fallas en el procesamiento.

Es de destacar que todos los productos cárnicos por nosotros analizados (Cuadro 3 - 3) son de marcas reconocidas de venta masiva en el área metropolitana pero, desde ya, sólo se ha muestreado un reducido sector del mercado de dichos productos.

La presencia de ENA detectada en todos los sistemas acuosos y cárnicos en los que coexistían sorbatos y nitritos en condiciones semejantes de composición y tratamiento a las posibles de ser encontradas en alimentos reales así como la detección de la presencia de sorbatos en productos cárnicos curados comerciales alertan sobre la importancia de una cuidadosa evaluación y control de las técnicas de preservación aplicadas y sobre la conveniencia de evitar la coexistencia en un mismo alimento de sorbatos y nitritos. Asimismo es aconsejable estudiar la cantidad de ENA con implicancias genotóxicas con el objetivo de evaluar el riesgo intrínseco al i) reemplazo parcial de nitritos por sorbatos y ii) empleo de sorbatos como antimicóticos en tripas de embutidos curados o superficies de productos cárnicos curados.

Se desea que este trabajo contribuya al desarrollo de alimentos sanos y nutritivos.

BIBLIOGRAFIA

Aalto T.R., Firman M.C., Rigler N.E. 1953. P - hydroxybenzoic acid esters as preservatives. I. Uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. *J. Am. Pharm. Assoc.* 42, 449.

Aguilera J.M., Parada Arias E. 1992. CYTED - D AHI an Ibero American project on intermediate moisture foods and combined methods technology. *Food Res. Int.*, 25, 159.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis. 1980. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC.

Appert N. 1810. *The Art of Preserving Animal and Vegetables Substances for Many Years*. Patris and Co., Paris, France.

Arya S.S. 1980. Stability of sorbic acid in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1246.

Arya S.S., Thakur B.R. 1988. Degradation products of sorbic acid in aqueous solutions. *Food Chem.* 29, 41.

Baldock J.D., Frank P.R., Graham P.P., Ivey, F.J. 1979. Potassium sorbate as a fungistatic agent in country ham processing. *J. Food Prot.* 42, 780.

Bard J., Townsend W.E. 1971. *The Science of Meat and Meat Products*. Ed W.H. Freeman Co., San Francisco, USA.

Bharucha K.R., Cross C.K., Rubin L.J. 1979. Mechanism of N - nitrosopyrrolidine formation in bacon. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 63.

Binkerd E.F., Kolari O.E. 1975. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. *Food Cosmet. Toxicol.* 13, 655.

Bøgh-Sorensen L. 1994. Description of hurdles. *Food Preservation by Combined Processes* (Leistner L., Gorris L.). Final report of FLAIR Concerted Action N°7, Subgroup B, European Commission, DG XII, Bruxelles, Belgium.

Boyd J.W., Tarr H.L.A. 1955. Inhibition of mold and yeast development in fish products. *Food Technol.* 9, 411.

Brooks J., Haines R.B., Moran T., Pace J. 1940. The function of nitrate, nitrite and bacteria in the curing of bacon and hams. *Res. Food Invest. Special Report N° 49*, London, U.K.

Bulman C., Ayres J.C. 1952. Preservation effect of various concentration of curing salts in comminuted pork. *Food Technol.* 6, 255.

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.

Bunton C.H., Dahn H., Loewe L. 1959. Oxidation of ascorbic acid and similar reductones by nitrous acid. *Nature* 183, 163.

Campos C. 1995. Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos. *Tesis doctoral*, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Campos C., Alzamora S., Gerschenson L. 1995. Sorbic acid stability in meat products of reduced water activity. *Meat Sci.* 41 (1), 37.

Campos C., Alzamora S., Gerschenson L. 1997. Sorbates destruction and non enzymatic browning in model aqueous systems. *Food Sci. and Tech. Int.* 3, 405.

Campos C., Chirife J., Alzamora S., Gerschenson L. 1991. An improved procedure for determining of sorbic acid in raw beef. *J. Food Sci.* 56 (3), 863.

Campos C., Gerschenson L. 1996. Effect of certain additives on sorbates stability. *Food Res. Int.* 29 (2), 147.

Campos C., Rojas A., Gerschenson L. 1996. Studies on the effect of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) on the sorbic acid degradation. *Food Res. Int.* (3 - 4), 147.

Cassens R.G., Greaser M.L., Ito T., Lee M. 1979. Reaction of nitrite in meat. *Food Technol.* 33 (7), 48.

Castellani A.G., Niven C.F. Jr. 1955. Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. *Appl. Microbiol.* 3, 154.

Code of Federal Regulations, Title 9. 1995. U.S. Office of the Federal Register, National Archives and Records Service, General Service Administration, Washington DC, USA.

Código Alimentario Argentino. 1994. Ed. De la Canal & Asoc., Buenos Aires, Argentina.

Council of European Economic Community. 1983. Official Journal N° L 123, 11 / 5 / 1983.

Crank J. 1956. *The Mathematics of Diffusion*. Ed. Oxford at the Clarendon Press, London, U.K.

Crosby N.T., Sawyer R. 1976. N - nitrosamines : a review of chemical and biological properties and their estimation of foodstuffs. *Adv. Food Res.* 21, 1.

Cross C.K., Zeigler P.J. 1965. A comparison of the volatile fractions from cured and uncured meats. *J. Food Sci.* 30, 610.

Curso Regional sobre Determinación de Plaguicidas en los Alimentos. 1995. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPAZZ), OPS, Martínez, Argentina.

Cheftel J.C., Cheftel H. 1976. *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Chichester D.F., Tanner F.W. 1975. Antimicrobial Food Additives. *Handbook of food additives*. Ed. T.E. Furia. CRC Press, Cleveland, USA.

Chirife J., Ferro Fontán C. 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., 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.

Christiansen L.N., Johnston R.W., Kautter D.A., Howard J.W., Aunan W.J. 1973. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. *Appl. Microbiol.* 26, 653.

Christiansen L.N., Tompkin R.B., Shaparis A.B., Johnston R.W., 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.

Christiansen L.N., Tompkin R.B., Shaparis A.B., Kueper A.B., Johnston R.W., Kautter D.A., Kolari O.J. 1974. Effect of sodium nitrite on toxin production by *Clostridium botulinum* in bacon. *Appl. Microbiol.* 27, 733.

Deak T., Novak E.K. 1972. Assimilation of sorbic acid by yeasts. *Chem. Abstr.* 77, 43.705.

Deibel R.H. 1979. Parabens, *An. Meat Ind. Res. Conf.*, American Meat Institute, Chicago, USA.

Deuel H.J. Jr., Alfin - Slater R., Weil C.S., Smith H.F. Jr. 1954. a. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmless of sorbic acid as a dietary component. *Food Res.* 19, 1.

Deuel H.J. Jr., Calbert C.E., Anisfeld L., Mc Keehan H., Blunden H.D. 1954. b. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. II. Metabolism of α - β unsaturated fatty acids with emphasis of sorbic acid. *Food Res.* 19, 13.

Di Fate V. G. 1977. Microbiological mutagenicity evaluation of sorbic acid / sodium nitrite reaction products. *Report submitted to the Expert Panel of Nitrites, Nitrates and Nitrosamines, U.S.D.A., Washington, USA.*

Draudt H.N., Deatherage F.E. 1956. Studies of the chemistry of cured meat pigment fading. *Food Res.* 21, 122.

Duncan C.L. 1970. Arrest of growth from spores in semi - preserved foods. *J. Appl. Bacteriol.* 33, 60.

Duncan C.L., Foster E.M. 1968. Effect of sodium nitrite, sodium chloride and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. *Appl. Microbiol.* 16, 406.

Dymicky M., Huhtanen C.N. 1979. Inhibition of *Clostridium botulinum* by p - hydroxybenzoic acid n - alkyl esters. *Antimicrobiol. Agents Chem.* 15, 798.

Edinger W.D., Splittstoesser D.F. 1986. Sorbate tolerance by lactic acid bacteria associated with grapes and wine. *J. Food Sci.* 51, 1077.

Eklund T. 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.* 54, 383.

Emard L.O., 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., Olson D.E. 1963. Effects of nitrate and some of its reduction products on carotene stability. *J. Agric. Food Chem.* 11, 140.

Ender F., Havre G., Helgebostat A., Koppang N., Madsen R., Ceh L. 1964. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften* 51, 637.

Fazio T., White R.H., Dusold L.R., Howard J.W. 1973. Nitrosopyrrolidine in cooked bacon. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56, 919.

Fazio T., White R.H., Howard J.W. 1971. Analysis of nitrite and / or nitrate processed meats for N- nitrosodimethylamine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 54, 1157.

Ferguson W. E., 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.

Ferro Fontán C., Chirife J., 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.

Fiddler W., Pensabene J.W., Piotrowski E.G., Phillips J.G., Keating J., Mergens W.J., Newmark H.L. 1987. Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by the use of cure - solubilized α - tocopherol. *J. Agric. Food Chem.* 26, 653.

Fox J.B. Jr. 1966. The chemistry of meat pigments. *J. Agric. Food Chem.* 14, 207.

Fox J.B. Jr. 1994. Los pigmentos de la carne. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos.* (Price J.F., Schweigert B.S.). Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Frey W. 1995. *Fabricación fiable de embutidos.* Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Gareis M., Bauer J., von Montegelas M., Gedek B. 1984. Stimulation of aflatoxin B₁ and T - 2 toxin production by sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 416.

Geminder J.J. 1959. Use of potassium and sodium sorbate in extending shelf - life of smoked fish. *Food Technol.* 13, 459.

Gerschenson L. 1991. *Valoración de aditivos en alimentos preservados.* Informe Interno de CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Gerschenson L., Alzamora S., Chirife J. 1986. a. Technical note : Kinetics of sorbic acid loss during storage of peaches preserved by combined factors. *J. Food Techn.* 21 (4) 517.

Gerschenson L., Alzamora S., Chirife J. 1986. b. Stability of sorbic acid in model food systems of reduced water activity : sugar solutions. *J. Food Sci.* 51, (4) 1028.

Gerschenson L., Alzamora S., Chirife J. 1987. Effect of sodium chloride and glycerol on the stability of sorbic acid solutions at reduced water activity. *Lebensm.- Wiss. und Technol.* 20, 98.

Gerschenson L., Campos C. 1995. Sorbic acid stability during processing and storage of high moisture foods. *Food Preservation by Moisture Control* (Barbosa Cánovas G., Welti Chanes J.). Ed. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, U.K.

Giannakopoulos A., Guilbert S. 1986. a. Determination of sorbic acid diffusivity in model food gels. *J. Food Techn.* 21, 339.

Giannakopoulos A., Guilbert S. 1986. b. Sorbic acid diffusivity in relation to the composition of high and intermediate moisture model gels and foods. *J. Food Techn.* 21, 477.

Goodfellow S.J. 1979. Update on developments in meat curing acidulants. *Meat Ind. Res. Conf.*, American Meat Institute, Chicago, USA.

Gooding C.M. 1945. Process of inhibiting growth of molds. *U.S. Patent* 2, 379, 294, USA.

Gooding C.M., Melnick D., Lawrence R.L., Luckmann F.H. 1955. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. IX. Physicochemical considerations in using sorbic acid to protect foods. *Food Res.* 20, 639.

Gould G.W., Brown M.H., Fletcher B.C. 1983. Mechanism of action of food preservation procedures. *Food Microbiology, Advances and Prospects.* (Roberts T.A., Skinner F.A.). Academic Press, New York, USA.

Gourama H., 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 J.I., Dugan L.R. Jr. 1975. Inhibition of N - nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40, 981.

Gray J.I., McDonald B., Pearson A.M., Morton I.D.J. 1981. Role of nitrite in cured meat flavor: a review. *J. Food Prot.* 44, 302.

Gray J.I., Randall C.J. 1979. The nitrite / N - nitrosamine problem in meats : an update. *J. Food Prot.* 42, 168.

Guerrero S., Alzamora S., Gerschenson L. 1990. Stability of sorbic acid in aqueous solutions of sodium chloride. *Lebensm.- Wiss. und Technol.* 23, 271.

Guilbert S., Giannakopoulos A., Cheftel J.C. 1985. Diffusivity of sorbic acid in food gels at high and intermediate water activities. *Properties of Water in Foods in Relation to Quality and Stability.* (Simatos D., Multon L.). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Guttenplan J.B. 1977. Inhibition by L - ascorbate of bacterial mutagenesis induced by two N - nitroso compounds. *Nature* 268, 368.

Hägglund H., Ringbom A. 1926. Über die sulfittaddition an ungesättigte verbindungen. *Z. Anorg. Allgem. Chem.* 150, 231.

Haldane J. 1901. The red color of salted meat. *J. Hyg. Camb.* 1, 115.

Hartman, P. 1983. Putative mutagens and carcinogens in foods. *Environ. Mut.* 5, 217.

- Havery D., Kline D., Miletta E., Joe F., Fazio T. 1976. Survey of food products for volatile N - nitrosamines. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 59, 540.
- Hayatsu H., Chung K., Kada T., Nakajima T. 1975. Generation of mutagenic compound(s) by a reaction between sorbic acid and nitrite. *Mut. Res.* 30, 417.
- Herring H.K. 1973. Effect of nitrite and others factors on the physicochemical characteristics and nitrosamine formation in bacon. *Proc. Meat Ind. Res. Conf.*, American Meat Institute, 47, Chicago, USA.
- Hoagland R. 1914. Coloring matter of raw and cooked salted meat. *J. Agric. Res.* 3, 211.
- Huang E., Armstrong J.G. 1970. The effect of microbial inhibitors on the storage life of cottage cheese exposed to ambient temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 3, 157.
- Huhtanen C.N., Wasserman A.E. 1975. Effect of added iron on the formation of clostridial inhibitors. *Appl. Microbiol.* 30, 768.
- Hustad G.O., Cerveny J.G., Trenk H., Deibel R.H., Kautter D.A., Fazio T., Johnston R.W., Kolari O.E. 1973. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. *Appl. Microbiol.* 26, 22.
- Ivey F.J., 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.
- Johnston M.A., Loynes R. 1971. Inhibition of *Clostridium botulinum* by sodium nitrite as affected by bacteriological medium in meat. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 4, 179.
- Kada T. 1974. DNA - damaging products from reaction between sodium nitrite and sorbic acid. *Annu. Rep. Nat. Inst. Genet.* 24, 43.
- Kahle F.M. 1980. Microbiological, sensory and physical evaluation of frankfurters formulated with combinations of sodium nitrite and potassium sorbate, *M.S. thesis*, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA.
- Kaul A., Singh J., Kuila R.K. 1979. Effect of potassium sorbate on the microbiological quality of butter. *J. Food Prot.* 42, 656.
- Kerr R.H., Marsh C.T., Schroeder W.F., Boyer E.A. 1926. The use of sodium nitrite in curing meats. *J. Agric. Res.* 33, 541.
- Kerr F.E. 1966. Patente inglesa 1.006.352; *Chem. Abstr.* 64, 1699.

Khandelwal G.D., Wedzicha, B.L. 1990. a. Nucleophilic reactions of sorbic acid. *Food Add. and Cont.* 7, 685.

Khandelwal G.D., Wedzicha B.L. 1990. b. Derivatives of sorbic acid - thiol adducts. *Food Chem.* 37, 159.

Kheddis B., Bahibah D., Hamdi M., Perié J.J. 1981. Dihydropyridones - dérivées de l' acid sorbique. *Bulletin Soc. Chem. de France* 3, 135.

Khoudokormoff B., Gist - Brocades N.V. 1978. Potential carcinogenicity of some food preservatives in the presence of traces of nitrite. *Mut. Res.* 53, 208.

Kito Y., Namiki M., Tsuji K. 1978. A new N - nitropyrrole. 1,4 - dinitro - 2 - methylpyrrole, formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Tetrahedron* 34, 505.

Kissalt K. 1899. Beitrage zur Kenntnis der Ursachen des Rotwerdens des Fleisches beim Kocken, nebst einigen Versuchen uber die Wirkung der schwefligen Saure auf die Fleischfarbe. *Arch. Hyg.* 35, 11.

Kolodziejaska I., Skonieczny S., Rubin L. 1990. Malondialdehyde - nitrite interaction in meat and model system. *J. Food Sci.* 55, 4, 925.

Kooyman E., Farenhorst E., Werner E. 1951. The nitrosation of methaliylchloride. *Recueil des travaux chimiques des Pays - Bas.* 70, 689.

Kyrtopoulos 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.

Lawrie R. A. 1977. *Ciencia de la Carne*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Lechowich R.V., Brown W.L., Deibel R.H., Somers I.I. 1978. The role of nitrite in the production of canned cured meat products. *Food Technol.* 32 (5), 45.

Lechowich R.V., Evans J.B., Niven C.F. 1956. Effect of curing ingredients and procedures on the survival and growth of staphylococci in and on cured meats. *Appl. Microbiol.* 4, 360.

Ledward, D.A. 1981. Intermediate moisture meats. *Developments in Meat Science II.* (Lawrie R.A.). Elsevier Applied Sc. Publishers, London, U.K.

Lee S.M., Kim C.E., Joe Y.I., Tank H.K. 1972. Isolation of sorbic acid from korean dry mountain ash berries. *Chem. Abstr.* 77, 33.003.

Lee S.H., Cassens R.G. 1976. Nitrite binding sites on myoglobin. *J. Food Sci.* 41, 969.

Lehman K.B. 1899. Über das Haemorrhodin, ein neues weitverbreitetes Blutfarbstoffderivat. *Zitzb. Physikal. Med. Ges. Würzburg.* 4, 57.

Leistner L. 1987. Shelf stable products and intermediate moisture foods based on meat. *Water Activity : Theory and Applications to Food* (Rockland L.B., Beuchat L.R.), Marcel Dekker, New York, USA.

Leistner L. 1992. Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.* 25, 151.

Leistner L. 1994. a. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. *J. Food Eng.* 22, 421.

Leistner L. 1994. b. Introduction to hurdle technology. *Food Preservation by Combined Processes.* (Leistner L., Gorris L.). Final report of FLAIR Concerted Action N° 7, Subgroup B, European Commission, DG XII, Bruxelles, Belgium.

Leistner L., Rödel W. 1975. The significance of water for microorganisms in meat. *Water relations of foods* (Duckworth R.B.), Academic Press, New York, USA.

Leistner L., Rödel W. 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms. *Intermediate Moisture Foods* (Davies R., Birch G.G., Parker K.J.), Applied Science Publishers, London, U.K.

Leistner L., Rödel W., Krispien K. 1981. Microbiology of meat products in high and intermediate moisture range. *Water activity Influences on food quality.* (Rockland L.B., Steward G.F.), Academic Press, New York, USA.

Lewis G.N., Randall M. 1961. *Thermodynamics.* Mc Graw Hill, London, U.K.

Liewen M.B., Marth E.H. 1985. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid : a review. *J. Food Prot.* 48, 364.

Lijinsky W., Conrad E., Bogart M.V. 1972. Carcinogenic nitrosamines formed by drug / nitrite interactions. *Nature.* 239, 165.

Lijinsky W., Epstein S.S. 1970. Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature* 225, 21.

Lueck E. 1976. Sorbic acid as a food preservative. *Int. Flavors Food Add.* 7, 122.

MacDonald B., Gray J.I., Gibbins L.N. 1980. a. Role of nitrite in cured meat flavor : antioxidant role of nitrite. *J. Food Sci.* 45, 893.

MacDonald B., Gray J.I., Kakuda Y., Lee M.L. 1980. b. Role of nitrite in cured meat flavor : chemical analysis. *J. Food Sci.* 45, 889.

- MacDonald B., Gray J.I., Stanley D.W., Osborne W.R. 1980. c. Role of nitrite in cured meat flavor : sensory analysis. *J. Food Sci.* 45, 885.
- MacDougall D.B., Mottram D.S., Rhodes D.N. 1975. Contribution of nitrite and nitrate to the colour and flavour of cured meats. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1743.
- Magee P.N., Barnes J.M. 1956. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer.* 10, 114.
- Marshall D.L., 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., Hussong R.V. 1966. Degradation of potassium sorbate by *Penicillium* species. *J. Dairy Sci.* 49, 1197.
- Martinez, S.M. 1991. *Hamburguesas un análisis del mercado argentino*. Informe Ganadero. Buenos Aires, Argentina.
- McCarthy, T.J., Eagler P.F.K. 1976. Further studies on glass-stored sorbic acid solutions. *Cosmet. Toiletries* 91, 33.
- Melnick D., Luckmann F.H. 1954. a. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. III. Spectrophotometric determination of sorbic acid in cheese and in cheese wrappers. *Food Res.* 19, 20.
- Melnick D., Luckmann F.H. 1954. b. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. IV. Migration of sorbic acid from wrapper into cheese. *Food Res.* 19, 28.
- Melnick D., Luckmann F.H., Gooding C.M. 1954. c. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. V. Resistance of sorbic acid in cheese to oxidative deterioration. *Food Res.* 19, 33.
- Melnick D., Vahlteich H.N., Hackett A. 1956. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. XI. Effectiveness of sorbic acid in protecting cakes. *Food Res.* 21, 133.
- Meyer V., Constam E.J. 1882. Ueber die Azaurolsauren, eine Reihe stickstoff haltiger Fettkorper. *Annalen* 214, 329.
- Minamidate M., Ogawara J., Ogawa T. 1973. Patente japonesa. *Chem Abstr.* 78, 158938.
- Minoda T., Niioda H. 1970. Patente japonesa 4.044; *Chem. Abstr.* 72, 121.016.
- Mirvish S.S. 1970. Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 44, 633.

- Mirvish S.S. 1971. Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N - alkylurethans and alkylguanidines : possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 46, 1183.
- Mirvish S.S. 1975. Formation of N - nitroso compounds, chemistry, kinetics and *in vivo* occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31, 325.
- Mirvish S.S., Wallcave L., Eagen M., Shubik P. 1972. Ascorbate - nitrite reaction : possible means of blocking the formation of carcinogenic N - nitroso compounds. *Science* 177, 65.
- Morgan D.J. 1959. The infra - red and ultra - violet spectra of ethylnitrolic acid and its sodium salt. *J. Appl. Chem.* 9, 201.
- Mosher H.S. 1950. *Heterocyclic Compounds*. vol.1, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Mottram D.S., Rhodes D.N. 1974. Nitrite and the flavour of cured meat. *Proc. Int. Symp. Nitrite in Meat Products*, 161, Zeits, Netherlands.
- Mouloud M., Metro F., Guotefongea R., Dumont J. 1992. Mass spectrometric study of derivatives formed by the reaction of oleic acid with nitrite. *Sci. Aliments* 12 (3), 371.
- Nakamura H., Nakajima T. 1970. Patente Japonesa 16.445. *Chem. Abstr.* 73, 87.446.
- Namiki M., Kada T. 1975. Formation of ethylnitrolic acid by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite. *Agric. Biol. Chem.* 39, 1335.
- Namiki M., Osawa T., Ishibashi H., Namiki K., 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., Tsuji K., 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 Mut. Environ.* 3, 109.
- Namiki M., Uda S., Osawa T., Tsuji K., Kada T. 1980. Formation of mutagen by sorbic acid - nitrite reaction : effect of reaction conditions on biological activities. *Mut. Res.* 73, 21.
- Newberne P.M. 1979. Nitrite promotes lymphoma in rats. *Science* 204, 1080.
- Noeltner G., Oehme H., Lademann R., Wendt F. 1980. Patente europea 4049. *Chem. Abstr.* 92, 25012.
- Obata H., Tanigaki H., Tanishita J., Tokuyama T. 1983. Formation of some reductones on the reaction of L - ascorbic acid with sodium nitrite. *Agric. Biol. Chem.* 1983, 47 (2), 419.

Ockerman H.W., Blumer T.N., Craig H.B. 1964. Volatile chemical compounds in dry cured hams. *J. Food Sci.* 29, 123.

Osawa T., Ishibashi H., Namiki M., Kada T. 1980. Desmutagenic actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrole mutagen formed by reaction between food additives; sorbic acid and sodium nitrite. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 95, 2, 835.

Osawa T., Ishibashi H., Namiki M., Kada T., Tsuji K. 1986. Desmutagenic action of food components on mutagens formed by the sorbic acid / nitrite reaction. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1971.

Osawa T., Ishibashi H., Namiki M., Yamanaka M., Namiki K. 1981. Formation of mutagens by pepper - nitrite reaction. *Mut. Res.* 91, 291.

Osawa T., Namiki K. 1982. Mutagen formation in the reaction of nitrite with the food components analogous to sorbic acid. *Agric. Biol. Chem.* 46, (9), 2299.

Paltrinieri G., Meyer M. 1990. *Elaboración de productos cárnicos*. Manuales para educación agropecuaria. Ed. Trillas, México DF, México.

Paquette M.W., Robach M.C., Sofos J.N., 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.

Pearson A., Gray J. 1983. Mechanism responsible for warmed - over flavor in cooked meat. *The Maillard reaction in foods and nutrition*. ACS Symp., Series N ° 215, American Chemical Society, Washington DC, USA.

Pederson M., Albury N., 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. 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.

Pierson M.D., Ivey F.J., Smoot L.A., Van Tassell K.R. 1979. Potassium sorbate inhibition of *Clostridium botulinum* in bacon. 79th Annual Meet. Am. Soc. Microbiol., Los Angeles, USA.

Pierson M.D., Rice K.M., Robach M.C. 1980. Influence of nitrite, sorbate and temperature on *Clostridium botulinum* growth. 80th Annual Meet. Am. Soc. Microbiol., Miami, USA.

Pierson M.D., Smoot L. 1982. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *Critical Rev. Food Sci. and Nutr.* 17, 141.

Piotrowski E.G., Zaika L.L., Wasserman A.E. 1970. Studies of aroma of cures ham. *J. Food Sci.* 35, 321.

Pivnick H., Barnett H.W., Nordin H.R., Rubin L.J. 1969. Factors affecting the safety of canned, cured, shelf - stable luncheon meat inoculated with *Clostridium botulinum*. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 2, 141.

Polenske E. 1891. Über den Verlust, welchen das Rindfleisch an Nährwert durch das Pokeln erleidet, sowie über die Veränderungen salpeter - haltiger Pokellaken. *Arb. K. Gesundh. Amt.* 7, 471.

Raduchev S., Rizvanov K. 1963. Sorbic acid as a carbon source of various microorganisms. *Chem. Abstr.* 59, 12.081.

Rehm H.J., Wallnofer P., Lukas E.M. 1964. The decomposition of sorbic acid in natural substrates by microorganisms. *Chem. Abstr.* 60, 1036.

Rehse K., Herpel M., Piechocki D. 1996. Nitrolic Acids. *Arch. Pharm. Med. Chem.* 329, 83.

Restaino L., Lenovich L.M., Bills S. 1982. Effects of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food Prot.* 45, 1138.

Riemann H. 1963. Safe heat processing of canned cured meats with regard to bacterial spores. *Food Technol.* 17, 39.

Riemann H. 1973. Botulinum food poisoning. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 6, 111.

Riemann H., Lee W., Genigeorgis C. 1972. Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi - preserved meat products. *J. Milk Food Technol.* 35, 514.

Robach M. C. 1980. Use of preservatives to control microorganisms in food. *Food Technol.* Oct., 81.

Robach M.C., DiFate V.G., Adam K., Kier L.D. 1980. a. Evaluation of the mutagenicity of sorbic acid - sodium nitrite reaction products produced in bacon - curing brines. *Food Cosmet. Toxicol.* 18, 237.

Robach M.C., Owens J.L., Paquette M.W., Sofos J.N., Busta F.F. 1980. b. 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., Pierson M.D. 1978. Influence of p - hydroxybenzoic acid esters on the growth and toxin production of *Clostridium botulinum* 10755A. *J. Food Sci.* 43, 787.

Roberts T.A. 1975. The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1755.

- Roberts T.A., Ingram M. 1966. The effect of sodium chloride, potassium nitrate and sodium nitrite on the recovery of heated bacterial spores. *J. Food Technol.* 1, 147.
- Roberts T.A., Ingram M. 1973. Inhibition of growth of *Clostridium botulinum* at different pH values by sodium chloride and sodium nitrite. *J. Food Technol.* 8, 467.
- Roland J.O., Beuchat L.R. 1984. Biomass and patulin production by *Byssochamys 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., Hitchcock, H.L. 1984. Effect of sorbate, benzoate, sulphur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssochamys nivea* in grape juice. *J. Food Prot.* 47, 237.
- Rubin L.J. 1977. Nitrites and nitrosamines in perspective. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 42, 1678.
- Rubin A.A., Zitowitz L., Hansker L. 1963. Acute circulatory effect of diazoxide and sodium nitrite. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 140, 46.
- Rust R.E. 1994. Productos embutidos. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. (Price J.F., Schweigert B.S.). Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Rust R.E., Olson D.G. 1973. *Meat Curing Principles and Modern Practice*. Koch Supplies Inc., Kansas City, USA.
- Sales C.A., Bowers J.A., Kropf D. 1980. Consumer acceptability of turkey frankfurters with 0, 40 and 100 ppm of nitrite. *J. Food Sci.* 45, 1060.
- Salo T. 1963. Die Komarowski-Farbreaktion mit Sorbinsäure. *Suomen Kemistilehti B.* 36, 1.
- Sato K. 1980. Patente Japonesa 163.516. *Chem. Abstr.* 92, 214.898.
- Sebranek J.G. 1979. Advances in the technology of nitrite use and consideration of alternatives. *Food Technol.* 33, 58.
- Sebranek J.G., Cassens R.G. 1973. Nitrosamines : a review. *J. Milk Food Technol.* 36, 76.
- Sebranek J.G., Schroder B.G., Rust R.E., Topel D.G. 1977. Influence of sodium erythorbate on color development, flavor and overall acceptability of frankfurters cured with reduced levels of sodium nitrite. *J. Food Sci.* 42, 1120.
- Shamma M., Rosenstock P.D. 1961. The synthesis and properties of some α,β - unsaturated valerolactams. *J. Org. Chem.* 26, 718.

Shank J.L., Silliker J.H., Harper R.H. 1962. The effect of nitric oxide on bacteria. *Appl. Microbiol.* 10, 185.

Shibasaki Y. 1969. Antimicrobial activity of alkyl esters of p - hydroxybenzoic acid. *J. Ferment. Technol.* 47, 167.

Silliker J.H. 1959. The effect of curing salts on bacterial spores. *Proc. 11th Res. Conf. Amer. Meat. Inst. Found.*, Washington DC, USA.

Silliker J.H., Greenberg R.A., Schack W.R. 1958. Effect of individual cured ingredients on the shelf stability of canned comminuted meats. *Food Technol.* 12, 551.

Simon S., Ellis D.E., MacDonald B.D., Miller D.G., Waldman R.C., Westerberg D.O. 1973. Influence of nitrite and nitrate curing ingredients on quality of packaged frankfurters. *J. Food Sci.* 38, 919.

Smith D.P., Rollin N.J. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent of foods. VII. Effectiveness of sorbic acid in protecting cheese. *Food Res.* 19, 59.

Smoot L.A.; Pierson M.D. 1979. Effect of oxidation - reduction potential on the outgrowth and chemical inhibition of *Clostridium botulinum* 10755A spores. *J. Food Sci.* 44, 700.

Smoot L.A., Pierson M.D. 1981. Mechanisms of sorbate inhibition of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spore germination. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 477.

Sofos J.N. 1989. *Sorbate Food Preservatives*. Academic Press, Florida, USA.

Sofos J.N., Busta F.F. 1980. Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. *J. Food Technol.* 35 (5), 244.

Sofos J.N., Busta F.F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Prot.* 44, 614.

Sofos J.N., Busta F.F. 1983. Sorbates. *Antimicrobials in Foods*. (Brannen A.L., Davidson P.M.). Marcel Dekker, New York, USA.

Sofos J.N., Busta F.F., 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., 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.

Sokal R., Rohlf F.J. 1980. *Introducción a la Bioestadística*, Ed. Reverté, Barcelona, España..

- Sperber W. 1983. Influence of water activity on food - borne bacteria. Review. *J. Food Prot.* 46, 142.
- Tannenbaum S.R. 1976. Relative risk of nitrite ingestion. *An. Meat Ind. Res. Conf.* 3, 25 American Meat Institute, Chicago, USA.
- Tannenbaum S.R. 1982. Modificaciones químicas y bioquímicas de los alimentos y su influencia sobre la calidad. *Introducción a la Ciencia de los Alimentos.* (Fennema O.R.) Ed. Reverté, Buenos Aires, Argentina.
- Tannenbaum S.R., Fett D., Young V.R., Land P.D., Bruce W.R. 1978. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science* 200, 1487.
- Tanner F.W., Evans F.L. 1933. a. Effect of meat curing solutions on anaerobic bacteria. *Zentralbl. Bakt. Parasitenk.* 88, 44.
- Tanner F.W., Evans F.L. 1933. b. Effect of meat curing solutions on anaerobic bacteria *Zentralbl. Bakt. Parasitenk.* 88, 48.
- Tanner F.W., Evans F.L. 1934. Effect of meat curing solutions on anaerobic bacteria. *Zentralbl. Bakt. Parasitenk.* 91, 1.
- Tarr H.L.A. 1941. a. The action of nitrites on bacteria. *J. Fish Res. Bd. Can.* 5, 265.
- Tarr H.L.A. 1941. b. Bacteriostatic action of nitrites. *Nature* 147, 417.
- Tarr H.L.A. 1942. The action of nitrites on bacteria. Further experiments. *J. Fish Res. Bd. Can.* 6, 74.
- Tarr H.L.A. 1944. Actions of nitrates and nitrites on bacteria. *J. Fish Res. Bd. Can.* 6, 233.
- Thakur B.R., Arya S.S. 1991. Role of sorbic acid in non - enzymatic browning in liquid and solid model food systems. *Int. J. of Food Sci. and Technol.* 26, 157.
- Townsend W.E., Olson D.G. 1994. Las carnes curadas y su procesado. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (Price J.F., Schweigert B.S.). Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Troller J.A., Christian J.H.B. 1978. *Water Activity and Food.* Academic Press, New York, USA.
- U.S. Department of Agriculture. 1978. Regulations: 43, 21.007; 36.697, USA.
- Verbiscar A.J., Campbell K.N. 1964. Unsaturated six - membered ring lactams. *J. Org. Chem.* 64, 2472.

Wasserman A.E., Talley F. 1972. The effect of sodium nitrite on the flavor of frankfurters. *J. Food Sci.* 37, 536.

Watts B.M. 1954. Oxidative rancidity and discoloration in meat. *Adv. Food Res.* 5, 1.

Wedzicha B.L., Brook M. A. 1989. Reaction of sorbic acid with nucleophiles : preliminary studies. *Food Chem.* 31, 29.

Wedzicha B.L., Picard C. 1993. Kinetics of the BSA - dependent reaction of sorbic acid with mercaptoethanol and its inhibition by hex - 3 - enoic acid. *Food Chem.* 48, 291.

Wedzicha B.L., Zeb A. 1990. a. Kinetics of the reaction between sorbic acid and thiols. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25, 230.

Wedzicha B.L., Zeb A. 1990. b. Catalysis of the reaction between sorbic acid and thiols by surfactants. *Int. J. Food Sci Technol.* 25, 168.

Wedzicha B.L., Zeb A. 1991. Catalysis of the sorbic acid - thiol reaction by bovine serum albumin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 26, 381.

Walker R. 1975. Naturally occurring nitrate / nitrite in foods. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1735.