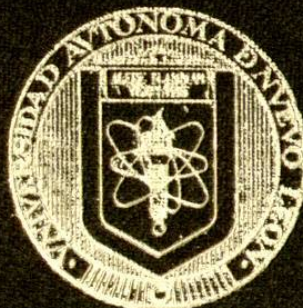


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



NIVELES DE ACIDO BENZOICO EN PRODUCTOS  
LACTEOS

Por

Q.C.B. AURORA DE JESUS GARZA JUAREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en  
Química Biomédica

Noviembre, 2001

TM  
TX556  
.M5  
G3  
c.1

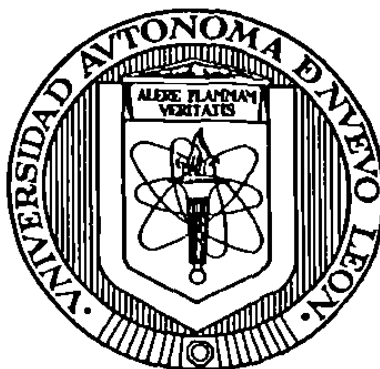
Q.C.B. AURORA DE JESUS GARZA JUAREZ



1080094996

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**NIVELES DE ÁCIDO BENZOICO EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

**Por**

**Q.C.B. AURORA DE JESÚS GARZA JUÁREZ**

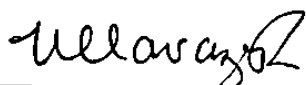
**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Química Biomédica**

**Noviembre, 2001**



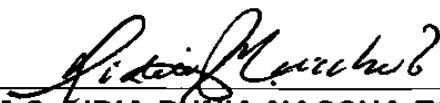
## NIVELES DE ÁCIDO BENZOICO EN PRODUCTOS LÁCTEOS

**Aprobación de la Tesis:**




---

**M.C. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA**  
Director de Tesis



---

**M.C. LIDIA RUJÍA NACCHA TORRES**  
Co-Director de Tesis



---

**DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES**  
Comisión de Tesis



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
SubDirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

# NIVELES DE ÁCIDO BENZOICO EN PRODUCTOS LÁCTEOS

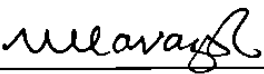
Presentado por:

Q.C.B. AURORA DE JESÚS GARZA JUÁREZ

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha y la coasesoría de la M.C. Lidia R. Naccha Torres.

## FIRMAS

ASESOR

  
M.C. Norma C. Cavazos Rocha

COASESOR

  
M.C. Lidia R. Naccha Torres

*Dedicada con todo mi amor a mis grandes tesoros:  
René, Renecito, Edgar y Erick.*



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, quién siempre ha estado a mi lado y me ha permitido lograr esta meta.

A mi gran amor René, por su enorme paciencia, amor e invaluable apoyo y comprensión, que me ha permitido lograr un objetivo más en mi vida.

A mis adorados hijos: René, Edgar y Erick por ser los mejores.

A mis padres, con respeto y admiración, por su gran amor, educación y ejemplo de vida.

A mis asesores: la M.C Norma C. Cavazos Rocha y la M.C. Lidia Naccha, por confiar en mí, por todo su tiempo, dedicación y comprensión.

A la Dra. Noemí Waksman, por cada una de sus enseñanzas tanto en lo académico como en lo personal.

Al Dr. Lorenzo Heyer, por su infinita ayuda desinteresada y por las valiosas aportaciones para la realización de esta tesis.

A todos los compañeros del Departamento de Química Analítica, de quienes siempre recibí gran apoyo.

## INDICE

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aditivos</b>	<b>1</b>
1.1.1 Definición y funciones	1
1.1.2 Aspectos legales	2
1.1.3 Clasificación	3
<b>1.2 Conservadores</b>	<b>4</b>
1.2.1 Definición	4
1.2.2 Función y mecanismos de acción	4
1.2.3 Propiedades	5
1.2.4 Eficacia	5
1.2.5 Grupos de conservadores	6
<b>1.3 Leche y derivados</b>	<b>7</b>
1.3.1 Leche	8
1.3.1.1 Importancia nutricional	9
1.3.1.2 Composición química	9
1.3.1.3 Tipos	10
1.3.1.4 Especificaciones sanitarias	12
1.3.2 Queso	13
1.3.2.1 Clasificación	13
1.3.2.2 Especificaciones sanitarias	14

1.3.3	Yogur	16
1.3.3.1	Elaboración	16
1.3.4	Helado	18
1.3.4.1	Elaboración	18
1.4	Métodos de conservación	18
1.4.1	Ácido benzoico	19
1.4.1.1	Metabolismo	20
1.4.1.2	Dosis de Referencia Oral	21
1.4.1.3	Legislaciones	21
1.4.1.4	Métodos de análisis	22
1.5	Descripción del problema	22
1.6	Objetivos	24
1.6.1	Objetivo general	24
1.6.2	Objetivos específicos	24
2.	MATERIAL Y MÉTODOS	26
2.1	Equipo, material y reactivos	26
2.1.1	Equipo	26
2.1.2	Material	27
2.1.3	Reactivos	28
2.1.4	Solventes	28
2.2	Establecimiento de las condiciones de análisis de AB por CLAR	29
2.2.1	Diseño factorial	29
2.2.2	Evaluación de parámetros cromatográficos	31

2.3	Desarrollo de un procedimiento para la extracción de AB en productos lácteos	32
2.3.1	Análisis de leche bronca	32
2.3.2	Tratamiento previo de la muestra	32
2.3.3	Extracción en fase sólida	33
2.3.4	Diseño factorial	34
2.3.5	Efecto de matriz	36
2.4	Validación	36
2.4.1	Linealidad	37
2.4.2	Precisión	38
2.4.2.1	Precisión del sistema	38
2.4.2.2	Precisión del método	38
2.4.3	Límite de detección	39
2.4.4	Límite de cuantificación	40
2.4.5	Exactitud	40
2.4.6	Robustez	41
2.5	Determinación de los niveles de AB en leche y quesos	43
2.5.1	Selección de muestras	43
2.5.2	Procesamiento de las muestras	43
3.	RESULTADOS	45
3.1	Condiciones cromatográficas	45
3.2	Tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida	46
3.2.1	Análisis de leche bronca	46

3.2.2	Porcentajes de recuperación	47
3.2.3	Efecto de matriz	49
3.3	Parámetros de validación	50
3.3.1	Linealidad, límites de detección y cuantificación	50
3.3.2	Precisión y exactitud	52
3.3.3	Robustez	53
3.4	Niveles de AB en leche y quesos	54
4.	DISCUSIÓN	57
4.1	Condiciones cromatográficas	57
4.1.1	Cálculo de N	57
4.1.2	Selección de velocidades de flujo	58
4.1.3	Selección de la fase móvil	59
4.2	Tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida	61
4.2.1	Análisis de leche bronca	61
4.2.2	Método de tratamiento previo de la muestra	61
4.2.3	Extracción en fase sólida	63
4.2.4	Efecto de matriz	64
4.3	Validación	65
4.3.1	Linealidad y límites de detección	66
4.3.2	Precisión y exactitud	66
4.3.3	Robustez	66
4.4	Niveles de AB	67

<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>69</b>
5.1 Conclusiones	69
5.2 Recomendación	70
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>71</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Cambios en la composición de la fase móvil y el pH del HAc 1M durante la Robustez.	42
II	Selección de condiciones cromatográficas para el análisis de AB.	46
III	Porcentajes de recuperación en la matriz de leche.	48
IV	Porcentajes de recuperación en diferentes matrices.	50
V	Precisión del sistema cromatográfico.	52
VI	Evaluación de la precisión del método.	53
VII	Resultados de Robustez.	54
VIII	Niveles de AB en leche y quesos.	55
IX	Cálculo de N a las tres velocidades propuestas.	58
X	Resultados con fase móvil de buffer de fosfatos (0.05 M pH 2.3) AcN 60:40.	60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Diseño factorial empleado para establecer las condiciones experimentales de análisis cromatográfico.	30
2	Diseño factorial para establecer las diferentes condiciones experimentales para el tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida.	35
3	Cromatogramas de estándar de AB de 60 ppm y de muestra de leche bronca.	47
4	Curva de calibración del ácido benzoico.	51
5	Cromatogramas de los productos lácteos.	56
6	Cromatogramas del estándar de AB. Fase móvil HAc (1M pH 4.5)-AcN 80:20 y Buffer de fosfatos (0.05 M pH 2.3)-AcN 60:40.	59



## LISTA DE ABREVIATURAS

### Abreviatura

AB	Ácido benzoico
AcN	Acetonitrilo
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
°C	Grados centígrados
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CG	Cromatografía de Gases
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de Variación
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
FA	Factor de Asimetría
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
FM	Fase móvil
FR	Factor de Respuesta
g	Gramo
g/L	Gramos por litro
g/mL	Gramos por mililitro
g/mol	Gramos por mol

GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro
HAc	Ácido acético
k'	Factor de capacidad
Kg	Kilogramo
M	Molaridad
MANOVA	Análisis de multivariancia
MeOH	Metanol
mg/ Kg max	Miligramos por kilogramo máximo
mg/día	Miligramo por día
mg/Kg/día	Miligramo por kilogramo por día
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetro
N	Número de platos teóricos
n	Tamaño de muestra
ND	No detectable
nm	Nanómetro
NMP/g	Número más probable por gramo
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación lineal
RfD	Dosis de referencia oral

SD	Desviación estándar
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
to	Tiempo muerto
tr	Tiempo de retención
UF/g	Unidades de fenol por gramo
UFC/g	Unidades formadoras de colonia por gramo
UI	Unidades Internacional
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen volumen
w	Ancho de base de pico
$\bar{X}$	Promedio
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$\mu\text{L}$	Microlitro

## RESUMEN

**Q.C.B. Aurora de Jesús Garza Juárez      Fecha de graduación: Noviembre del 2001**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del estudio: NIVELES DE ÁCIDO BENZOICO EN PRODUCTOS LÁCTEOS.**

**Número de páginas: 73**

**Candidato para el grado de maestría en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.**

**Área de estudio: Química Analítica.**

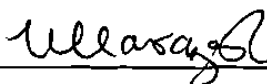
### **Propósito y Método de Estudio:**

El ácido benzoico (AB) es el conservador más empleado en los productos lácteos para aumentar su tiempo de vida en anaquel. Debido a que los productos lácteos son un alimento de primer orden, cuyo mayor consumidor es la población infantil, surgió la necesidad de contar con un método eficiente para la determinación de AB en este tipo de alimentos. En el presente trabajo se determinaron los niveles de AB en productos lácteos que se expenden en el área metropolitana de Monterrey. En la primer etapa se establecieron las condiciones de análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, probándose tres fases móviles y tres velocidades de flujo diferentes. Además se desarrolló un procedimiento para la extracción del AB en los productos lácteos, para lo cual se probaron dos métodos de tratamiento previo, el método de desproteínización ácida y el de ultrasonido. Los filtrados obtenidos por ambos métodos fueron sometidos a extracción en fase sólida empleando cartuchos Sep-pack  $C_{18}$ , bajo diferentes condiciones experimentales. En la segunda etapa se validó el método desarrollado y finalmente se determinaron los niveles de AB en: leche fresca, queso Panela, tipo Petit suisse, Oaxaca, Chihuahua y Manchego.

### **Contribuciones y Conclusiones:**

Se cuenta con un método cromatográfico para la determinación de AB en productos lácteos. Las condiciones cromatográficas establecidas fueron: fase móvil de  $HC_2H_3O_2$  (1M pH 4.5)-Acetonitrilo 80:20, con velocidad de flujo de 1.3 mL/min y detección a 230 nm. La mejor reproducibilidad se obtuvo con el método de ultrasonido, acidificando la muestra previo a la extracción a pH de 1 y eluyendo con 1 mL de AcN. El coeficiente de variación del método fue menor del 10%, lo que nos permitió cuantificar adecuadamente los niveles de AB en estos productos. Todos los productos presentaron niveles de AB dentro de las concentraciones máximas permisibles, excepto para el caso del queso tipo Petit suisse.

**FIRMA DEL ASESOR:** \_\_\_\_\_



## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Aditivos**

##### **1.1.1 Definición y funciones**

Los aditivos son sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o su conservación. En esta definición no se incluyen contaminantes, como lo son los plaguicidas, antibióticos, elementos radioactivos, fertilizantes, metales pesados o el material que inadvertidamente forma parte del alimento (Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994).

Dentro de las funciones de los aditivos destacan las siguientes: mejorar el nivel nutritivo del alimento, conservar su frescura, impedir el deterioro causado por los microorganismos e insectos, generar alguna propiedad sensorial deseable o bien, como ayuda del proceso (Valle Vega Pedro. Toxicología de Alimentos. 1991).

### 1.1.2 Aspectos legales

La legislación mexicana sobre aditivos establece que queda prohibido el uso de éstos para: a) ocultar defectos de calidad; b) encubrir alteraciones y adulteraciones en la materia prima o en el producto terminado; c) disimular materias primas no aptas para el consumo humano; d) ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte; e) reemplazar ingredientes en los productos que induzcan a error o engaño sobre la verdadera composición de los mismos y f) alterar los resultados analíticos de los productos en que se agregan (“Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios”. Diario Oficial de la Federación. 18 de enero de 1988).

### 1.1.3 Clasificación

La legislación mexicana sobre aditivos, el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios expedida en 1988 establece los siguientes grupos de aditivos, de acuerdo con su función:

- a) Acentuadores de sabor
- b) Acidulantes, alcalinizantes y reguladores de pH
- c) Antiaglomerantes
- d) Antiespumantes
- e) Antihumectantes
- f) Antioxidantes
- g) Antisalpicantes
- h) Colorantes y pigmentos
- i) Conservadores
- j) Edulcorantes sintéticos
- k) Emulsivos, estabilizadores y espesantes
- l) Enturbiadores
- m) Enzimas
- n) Espumantes
- o) Gasificantes para panificación
- p) Hidrolizantes
- q) Humectantes
- r) Ingredientes para gomas de mascar

- s) Leudantes
- t) Oxidantes
- u) Saboreadores y aromatizantes.

## **1.2 Conservadores**

### **1.2.1 Definición**

Los conservadores son sustancias químicas que al ser añadidas intencionalmente al alimento, tienden a prevenir o retardar el deterioro causado en ellos por la acción de los microorganismos. En esta definición quedan excluidos los azúcares, vinagres, especias o sus aceites, a pesar de que se han usado desde la antigüedad para este fin, ya que su función más importante es la impartición de sabor (Valle Vega P., 1991).

### **1.2.2 Función y mecanismo de acción**

Las alteraciones experimentadas por los alimentos pueden ser ocasionadas por microorganismos, por enzimas o por reacciones puramente químicas. La inhibición de la



multiplicación y de la actividad de los microorganismos es uno de los principales objetivos del empleo de los conservadores.

Los conservadores inhiben la multiplicación microbiana dañando la membrana celular u obstaculizando la actividad enzimática y los mecanismos genéticos (W. C. Frazier. Microbiología de los Alimentos. 1993).

### 1.2.3 Propiedades

Se considera un conservador ideal aquel que inhiba tanto mohos, bacterias y levaduras, que no sea tóxico para el ser humano, fácilmente biotransformable por el hígado, no acumulable en el medio ambiente o en organismos vivos, soluble en agua, estable, que no imparta sabor ni olor y que sea de bajo costo. En la actualidad son pocos los conservadores “ideales” y muchos de los que se proponen no llegan a alcanzar la categoría de aditivos comercialmente aceptables (Robach M.C. .1980).

### 1.2.4 Eficacia

La eficacia de un conservador para inhibir tanto la multiplicación como la actividad metabólica de los microorganismos depende de varios factores: a)

especificidad de acción: algunos tienen un espectro muy amplio de acción, mientras que otros son específicamente efectivos contra un determinado tipo de microorganismo; b) composición del alimento: el pH, la fuerza iónica, la actividad acuosa, la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos, etc. c) nivel inicial de la contaminación: los productos altamente contaminados no pueden controlarse con la adición normal de estos aditivos, y d) manejo y distribución del producto terminado: la conservación de los alimentos no solo debe recaer en los aditivos, sino que requiere de un manejo adecuado para evitar nuevas contaminaciones microbianas (Robach M.C.. 1980).

#### 1.2.5 Grupos de Conservadores

Los conservadores antimicrobianos que se añaden a los alimentos se pueden incluir en los siguientes grupos:

- a) Aquellos que se añaden a los alimentos sin estar definidos como tales por la ley, ejemplos de ellos son: los ácidos orgánicos naturales (láctico, málico, acético, etc.) y sus sales, el cloruro sódico, los azúcares, las especias y sus aceites, el humo de la madera, el dióxido de carbono, y el nitrógeno.
- b) Sustancias generalmente admitidas como inocuas (GRAS: generally recognized as safe) para ser añadidas a los alimentos: el ácido propiónico y los propionatos sódico y potásico, el ácido caprílico, el ácido sórbico y los sorbatos potásico, sódico y cálcico, el ácido benzoico y los benzoatos y derivados del ácido benzoico tales como el metilparabeno y el propilparabeno, el diacetato sódico, el

dióxido de azufre y los sulfitos, metabisulfitos sódicos y potásicos y el nitrito sódico.

- c) Compuestos químicos considerados aditivos alimentarios, que incluirían todos los no citados en los dos primeros grupos. Solo se pueden utilizar cuando se ha comprobado que son inocuos tanto para las personas como para los animales, en cuyo caso se incluyen en el último grupo.
- d) Compuestos químicos cuya inocuidad se ha comprobado y que están autorizados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) (W.C. Frazier, *Microbiología de los Alimentos* 1993).

### **1.3 Leche y derivados**

Entre los alimentos de importancia nutricional que hacen uso de los conservadores para aumentar su tiempo de vida en anaquel se encuentran los productos lácteos, los cuales juegan un papel fundamental en la alimentación humana. Los productos lácteos son: 1) los productos a base de leche, es decir los derivados exclusivamente de la leche. A estos productos se les puede añadir sustancias necesarias para su elaboración, siempre y cuando estas sustancias no se utilicen para sustituir, total o parcialmente, alguno de los componentes de la leche y 2) los productos compuestos de leche, en los que la leche o un producto lácteo es la parte esencial, ya sea por su cantidad o por el efecto que caracteriza a dichos productos, y en los que ningún

elemento sustituye ni tiende a sustituir a ningún componente de la leche (Pascual Anderson. Microbiología de Alimentos. 2000)

### 1.3.1 Leche

La leche para consumo humano, es el producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, o de otras especies animales. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro. La denominación de leche sin indicación de la especie, se refiere a la leche de vaca. Cuando se trata de leche perteneciente a otras especies domésticas, se exige el nombre de la especie (Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994).

La leche se produce a base de componentes de la sangre en la ubre de la vaca. La operación de ordeña estimula la liberación de hormonas de la sangre que, a su vez, actúan sobre los músculos de la ubre, causando el descenso de la leche a los cuatro canales de las tetas (Potter Norman N.. La Ciencia de los Alimentos. 1973).

### 1.3.1.1 Importancia nutricional

La leche es un alimento de primer orden, ya que es un alimento completo desde el punto de vista nutricional, además de su alta capacidad de absorción que es casi del 100%; así mismo sus componentes intervienen en reacciones bioquímicas importantes para el crecimiento celular. Posee proteínas de buena digestibilidad y alta calidad que aportan aminoácidos esenciales. Los lípidos son fácilmente absorbidos y proporcionan ácidos grasos esenciales. La leche es fuente importante de minerales constituyentes del sistema óseo como calcio, potasio, fósforo, magnesio y sodio. Además, también aporta vitaminas como la A y D entre otras, siendo la primera esencial para la visión, el crecimiento, la diferenciación celular, la reproducción y la integridad del sistema inmunitario. La vitamina D y sus metabolitos funcionan como componentes principales del sistema endocrino que regula el metabolismo del hueso, lo cual lleva a clasificarla como una prohormona (Samuel J. Fomon. Nutrición del lactante. 1995).

La leche ha sido descrita como el alimento más perfecto del hombre desde el punto de vista de la nutrición (Potter Norman N.. La Ciencia de los Alimentos. 1973).

### 1.3.1.2 Composición química

La composición media de la leche es la siguiente: 87% de agua, 3.5 % de proteínas, correspondiendo un 2.7 a la caseína; el contenido de lípidos es del 3.5 al 4.0%, las sales minerales están presentes en la leche en una relación del 0.7% como sales de sodio, potasio, calcio, hierro, magnesio y fósforo, también presenta vitaminas hidrosolubles como la vitamina C, las del complejo B, niacina, ácido pantoténico, ácido

fólico, biotina, colina e inositol; así mismo aporta vitaminas liposolubles del tipo A, D, E y K.

Contiene también enzimas como lactenina, lactoperoxidasa, catalasa, reductasa, lipasa, fosfatasa, proteasa, amilasa y lisozima. La lactenina, lactoperoxidasa y lisozima tienen actividad inhibidora.

Su pH está comprendido entre 6.5 y 6.7 y expresa solo la concentración de hidrógeno, es decir es una solución ligeramente ácida.

La composición de la leche puede variar de acuerdo con distintos factores como: la raza de la vaca, siendo las principales razas productoras de leche Ayrshire, Suiza, Parda, Guernsey, Holstein y Jersey; así mismo otros factores son la individualidad, la edad, la etapa de lactancia, la estación del año, el alimento, la hora de la ordeña, el intervalo entre ordeñas y la condición física de la vaca (Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria. 2000).

#### 1.3.1.3 Tipos

Existen diferentes tipos de leches; las cuales se diferencian en función a su procesamiento:

- a) Leche pasteurizada: es la leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, sometida a un proceso tecnológico adecuado que asegure la destrucción de los gérmenes patógenos y la casi totalidad de la flora banal, sin modificación

sensible de su naturaleza físico-química, características biológicas y cualidades nutritivas.

- b) Leche concentrada: es la leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, pasteurizada y privada de parte de su agua de constitución.
- c) Leche esterilizada: es la leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, sometida después de su envasado a un proceso de calentamiento en condiciones de temperatura y tiempo, tales que aseguran la destrucción de los microorganismos y la inactividad de sus formas de resistencia.
- d) Leche UHT: corresponde a la leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, sometida a un proceso de calentamiento en condiciones tales de temperatura y tiempo que aseguran la destrucción de los microorganismos y la inactividad de sus formas resistentes, y envasada posteriormente en condiciones sépticas.
- e) Leche en polvo: es el producto seco y pulverulento que se obtiene mediante la deshidratación de la leche natural, entera o total o parcialmente desnatada, sometida a un tratamiento térmico equivalente, al menos, a la pasteurización, y realizado en estado líquido antes o durante el proceso de fabricación.
- f) Leche evaporada: corresponde a la leche que es sometida, en el mismo envase en que se suministra al consumidor, a tratamiento térmico que asegure la destrucción de los gérmenes y la inactividad de sus formas resistentes (Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria. 2000).

#### 1.3.1.4 Especificaciones sanitarias

La leche pasteurizada debe cumplir con las siguientes especificaciones:

- a) Físicas: la leche debe estar libre de materia extraña, debe presentar su color, olor y sabor característico.
- b) Fisicoquímicas: debe dar reacción negativa a la prueba de fosfatasa y a la de inhibidores. Tener una acidez mínima de 1.3 o máxima de 1.7 g/L expresada como ácido láctico.
- c) Aditivos: en la elaboración de la leche pasteurizada de vaca con sabor, se permite el empleo de los siguientes aditivos para alimentos dentro de los límites permisibles: acidulantes, alcalinizantes o reguladores de pH, emulsivos y estabilizadores, colorantes y saborizantes. También se permite el empleo de edulcorantes que, la elaboración de la leche pasteurizada de vaca con sabor son sintéticos; así mismo, en la leche que contenga 16 g/L de grasa como máximo deberá ser restaurada con 2000 UI de vitamina A. Se prohíbe el empleo de conservadores en la elaboración de la leche fresca, pero se permite la presencia de ácido sórbico, benzoico o sus sales de sodio y potasio como efecto de la transferencia de los ingredientes opcionales en la leche pasteurizada de vaca con sabor ( Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994).



### 1.3.2 Queso

El queso es el producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenado, prensado o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos.

#### 1.3.2.1 Clasificación

En función a su proceso los quesos pueden ser: frescos, maduros o procesados.

Los quesos frescos se caracterizan por ser productos con alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración. Estos quesos son de consistencia desde untable hasta rebanable, de aroma y sabor característico sin olores y sabores ajenos. Los quesos frescos, a su vez, se clasifican en: a) Frescales donde se incluyen: al Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado y Adobado; b) De pasta cocida como: el Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral y Adobera; y c) Acidificados que incluye: al Cottage, Crema, Doble crema, Pettit Suisse y Nuefchatel.

Los quesos maduros pueden ser: a) Madurados prensados de pasta dura: como el Añejo, Parmesano, Cotija y Reggianito; b) Madurados prensados: que incluye el Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint, Paulin, Samsøe, Svecia, Tilsiter, Bola y Jack ; y c) De maduración con mohos: como el Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo y Brie.

El último tipo de quesos son los procesados entre los que se incluyen los quesos fundidos y los fundidos para untar.

#### 1.3.2.2 Especificaciones sanitarias

Los quesos deben cumplir con las siguientes especificaciones:

##### a) Organolépticas

Los quesos frescos o frescales deben ser de consistencia desde untable hasta rebanable, de aroma y sabor característico sin olores ni sabores ajenos. Los quesos maduros son de consistencia desde blanda hasta extradura sin aromas y sabores ajenos, pueden presentar o no ojos típicos de fermentación o vetas coloreadas de los mohos empleados para su maduración. Los quesos procesados en general deben cumplir con lo señalado para los quesos frescos.

##### b) Químicas

Los quesos no deben rebasar 12 UF/ g de fosfatasa residual

### c) Microbiológicas

De acuerdo con la Secretaría Salud en ninguno de estos productos debe detectarse la presencia de *Salmonella* o *Listeria monocytogenes*. Se pudiera detectar la presencia de coliformes fecales en un límite máximo de 100 NMP/g para los quesos frescales y para los quesos maduros de 50 NMP/g.; así mismo el límite máximo para el *Staphylococcus aureus* es de 100 UFC/g para los quesos tanto frescos como maduros y menos de 100 UFC/g para los quesos procesados. También pudiera detectarse la presencia de hongos y/o levaduras en un límite máximo de 500 UFC/g para los quesos frescos y maduros y de 100 UFC/g para los quesos procesados.

### d) Aditivos

En la elaboración de los quesos madurados y procesados se permite el empleo de los siguientes colorantes naturales: b-caroteno BPF (Buenas Prácticas de Fabricación), Clorofila BPF, Oleorresina de pprika BPF, Riboflavina BPF, Achiote o Anatto (10 mg/kg max) y Beta-apo-8'-carotenal (35 mg/kg max). En los quesos Petit Suisse sólo se permite la presencia de colorantes orgánicos sintéticos como efecto de transferencia de los ingredientes opcionales.

Con respecto a los conservadores se permite el empleo del ácido sórbico, propiónico o benzoico y sus respectivas sales de sodio y potasio en una concentración máxima de 0.1% para los quesos madurados y 0.3% para los procesados (Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994).

### 1.3.3 Yogur

Se entiende por yogur o yoghurt, el producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, suero en polvo, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche. Los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en cantidad mínima de  $1 \times 10^7$  colonias por gramo o mililitro.

Todos los yogures deben tener un pH igual o inferior a 4.6 (Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria. 2000).

#### 1.3.3.1 Elaboración

El yogurt se elabora a partir de leche entera o descremada. Este producto también se conoce como leche cuajada búlgara. La elaboración del yogurt consiste en las siguientes operaciones:

- a) Estandarización de la leche
- b) Pasteurización
- c) Homogenización

- d) Concentración
- e) Siembra
- f) Envasado
- g) Incubación
- h) Refrigeración

La leche más apropiada para elaborar yogurt es la que tiene un elevado contenido de proteínas. La leche se pasteuriza a 90°C durante 60 segundos o a 85°C durante 30 minutos. La homogenización reduce el tamaño de los glóbulos grasos, lo que evita la subida de la nata durante el almacenamiento del yogurt. La homogenización también aumenta el volumen de las partículas de caseína. Como consecuencia, éstas se aglutinan en menor grado durante la coagulación resultando en un coágulo más blando que en el caso de leche no homogenizada. La concentración se puede efectuar por evaporación y por adición del 3% de leche en polvo descremada. La siembra de la leche se realiza adicionando un 3% del cultivo láctico que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaris* en proporciones iguales. Inmediatamente después de la siembra, se envasa la leche. La leche envasada se incuba directamente a una temperatura de 45 °C hasta que el producto haya alcanzado un pH de 4.5. Después de la incubación se debe enfriar el yogurt rápidamente por debajo de 10 °C para detener una excesiva acidificación (Ir. Meyer Marco R., Elaboración de Productos Lácteos.1983).

### 1.3.4. Helado

En la fabricación del helado se emplean ingredientes lácteos de muchas formas. Estos pueden incluir leche entera, leche descremada, crema, crema congelada, productos de leche condensada, y productos de leche en polvo. La composición del helado es a base de grasa de leche y sólidos de leche no grasos derivados de los ingredientes mencionados anteriormente, además de azúcar, estabilizadores, emulsionantes, materiales saborizantes, agua y aire.

#### 1.3.4.1 Elaboración

En la fabricación del helado la mezcla es pasteurizada , posteriormente se enfría y se deja madurar pocas horas, después de esto se somete a congelación batiéndola para mejorar la textura y aumentar el volumen (Kirk R. S., Análisis Químico de Alimentos de Pearson. 1996).

## 1.4 Métodos de conservación

El avance tecnológico ha mejorado los procesos para incrementar la vida en anaquel de los alimentos lácteos, utilizando tanto tratamientos térmicos, como la pasteurización, así como empleando aditivos.

La pasteurización es el proceso en el cual el producto es sometido a una adecuada relación de temperatura y tiempo para destruir la flora bacteriana patógena y casi la totalidad de la flora banal. Dos métodos diferentes de pasteurización pueden llevarse a cabo: una pasteurización lenta, en donde el producto se somete a una temperatura de 63 °C por un período mínimo de 30 minutos, o una pasteurización rápida, que consiste en someter el producto a una temperatura de 72 °C sosteniéndola por un período mínimo de 15 segundos. Una vez alcanzadas las temperaturas y tiempos señalados, se enfrían los productos bruscamente a 4 °C ( Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA-1994).

Dentro de los aditivos, los conservadores empleados en productos lácteos son: formaldehído, agua oxigenada, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido paraoxibenzoico y ácido bórico. De esta lista el más utilizado es el ácido benzoico.

#### 1.4.1 Ácido benzoico (AB)

El ácido benzoico ( $C_7H_6O_2$ ) de peso molecular 122 g/mol, posee una apariencia física de gránulos blancos o polvo cristalino, sin olor, su solubilidad es de 3.4 g/L a 25 °C y su densidad es de 1.44 g/mL. Presenta su máxima absorción en el rango del ultravioleta (UV) a 230 nm ( MSDS-Material Safety Data Sheet 1999).

En forma natural, el AB se encuentra en la canela, el clavo, las ciruelas (0.05%) otras frutas y en algunas flores. La forma no disociada del ácido es la que presenta actividad antimicrobiana principalmente contra bacterias y levaduras y en menor grado contra mohos, por lo que el pH tiene un efecto decisivo en su efectividad; se observa que a pH menor de 4.0 existe una proporción alta sin disociar (94%) por lo que su rango óptimo de acción es a valores de pH de 2.5 a 4.0. Por esta razón es un conservador ideal para alimentos ácidos como jugos de frutas, bebidas carbonatadas, postres y alimentos fermentados.

Debido a que la solubilidad del ácido es baja (3.4 g/L a 25 °C), se prefiere utilizar su sal, el benzoato de sodio, el cual posee una solubilidad de 550 g/L a 25 °C . Este compuesto, una vez en el alimento, se convierte en la forma no disociada del ácido.

#### 1.4.1.1 Metabolismo

El ácido benzoico no causa problemas de toxicidad en el hombre cuando se ingiere en las concentraciones que normalmente se permiten en los alimentos, ya que se elimina en forma de ácido hipúrico en la orina una vez que ha sido conjugado con glicina ,en el hígado, en una reacción de detoxificación (Badui. Química de Alimentos. 1999).



#### 1.4.1.2 Dosis de Referencia Oral (RfD)

La Administración de Alimentos y Drogas (FDA) define la dosis de referencia oral como la cantidad de un agente químico que una persona adulta de 70 Kg puede asimilar diariamente durante 70 años, sin que exista un efecto adverso en la salud.

Esta misma agencia estableció una dosis de referencia oral de 4.4 mg/Kg/día y estima una ingesta per cápita de 0.9 – 34 mg/día para el AB y de 34 – 328 mg/día para el benzoato de sodio. Si tomamos el valor medio de estas cantidades un adulto de 70 Kg estaría recibiendo una dosis de 5.31 mg/Kg/día de AB la cual sobrepasa RfD para un adulto de 70 Kg. Sin embargo, si se considera a un niño de 12 Kg es probable que este recibiendo una dosis 7 veces mayor a la recomendada (Food and Drug Administration 1973).

#### 1.4.1.3 Legislaciones

Las legislaciones vigentes autorizan el empleo de AB en: bebidas refrescantes, conservas de frutas y vegetales, jugos de frutas, galletas, productos de confitería y productos lácteos, pero esta prohibida su adición en leche fresca. Se permite así su uso en un rango de concentración de 0.05 a 0.1% en peso como benzoato de sodio. Este porcentaje esta basado en la RfD para la población adulta más no para la población infantil (Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. 1988.).

#### 1.4.1.4 Métodos de Análisis

Diferentes métodos han sido desarrollados para la determinación de AB en alimentos, entre los que se encuentran: la Cromatografía en Capa Fina (CCF), la Espectrofotometría ultravioleta (UV), la Cromatografía de Gases (CG) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) (Kantasubrata Julia 1991, Suárez M.A. 1997, Callul M. 1992, Hannisdal Atle 1991, Delaney Michael 1985, Mannino S. 1996, Terada Hisaya 1985, Torres Caio 1990, Manino S. 1996).

### 1.5 Descripción del problema

Los aditivos se deben emplear como una ayuda en la fabricación de los alimentos, pero nunca para enmascarar materias primas o productos finales de mala calidad; en este sentido, los aditivos deben ser usados de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura.

Cada país tiene sus propias leyes al respecto y algunos de ellos llevan a cabo análisis toxicológicos para demostrar la seguridad o la inocuidad de cada aditivo.

En general, las leyes sanitarias permiten usar los aditivos en determinadas concentraciones máximas, que previamente se establecen según los resultados de los análisis toxicológicos; dichos máximos son muchas veces menores (100 o más) que las dosis que llegan a causar daño a los animales. De manera que, sólo consumiendo una

excesiva cantidad de aditivo puede presentarse algún problema de toxicidad en el humano (Badui. Química de los Alimentos. 1995).

El empleo de conservadores en los alimentos aumenta a medida que los países adquieren un grado tecnológico y económico más avanzado, ya que este nivel de vida requiere de un mayor número de alimentos preparados en buen estado y listos para servirse.

Los productos lácteos emplean AB como conservador. Este es una sustancia GRAS, ya que no causa problemas de toxicidad en el hombre cuando se ingiere en las concentraciones normales. No existen estudios de riesgo carcinogénico por exposición oral . Sin embargo, la literatura reporta que a concentraciones elevadas (100x) puede causar irritación del tracto digestivo y en situaciones extremas convulsiones epileptiformes (Jacobson. 1972).

Los métodos de análisis existentes para la determinación de AB no han sido aplicados a productos lácteos ya que están descritos para otro tipo de alimentos como jugos de frutas, bebidas carbonatadas o conservas de frutas y vegetales (AOAC Official Methods of Analysis. Marzo 1998). La metodología de extracción mostrada en la literatura para este tipo de alimentos no es adecuada para los productos lácteos debido a que son alimentos con alto contenido de proteínas y grasa. Por otro lado, otra metodología existente para la extracción de este ácido en alimentos sólidos y viscosos involucra una serie de procesos que resultan en un tiempo largo de análisis y resultados de baja precisión.

De manera que, siendo los productos lácteos alimentos de primer orden y cuyo mayor consumidor es la población infantil, surge la necesidad de contar con un método eficiente para controlar la cantidad adicionada permitida en ciertos productos lácteos, así como para detectar la presencia del AB en aquellos productos en los cuales no se permite su empleo.

## **1.6 Objetivos**

Por lo anterior, el presente trabajo se lleva acabo bajo los siguientes objetivos:

### **1.6.1 Objetivo general**

Determinar los niveles de AB en productos lácteos que se expenden en el área metropolitana de Monterrey.

### **1.6.2 Objetivos específicos**

- 1 Establecer las condiciones de análisis del AB por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).**

- 2 Desarrollar un procedimiento de extracción de AB en productos lácteos.
- 3 Validar el método desarrollado para el análisis de AB en productos lácteos.
- 4 Determinar los niveles de AB en leche fresca y quesos que se expenden en el área metropolitana de Monterrey.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 Equipo, material y reactivos**

##### **2.1.1 Equipo**

- a) *Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Beckman System Gold, con bomba modelo 168 y detector UV visible con arreglo de diodos.*
- b) *Baño de ultrasonido Fisher Scientific FS20*
- c) *Potenciómetro Orion EA 940*
- d) *Balanza Analítica Mettler H80*
- e) *Bomba de vacío Welch Thomas modelo 2534B-01*
- f) *Plancha de calentamiento Thermolyne*

### 2.1.2 Materiales

- a) Cartuchos Sep-pack C<sub>18</sub>
- b) Columna fase reversa C<sub>18</sub> de dimensiones 150 mm x 4.6mm x 5µm
- c) Matraces de aforación de 10, 50,100 y 1000 mL
- d) Matraz Kitasato de 250 y 100 mL
- e) Embudo Buchner
- f) Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- g) Refrigerantes
- h) Mangueras de plástico
- i) Pipeta automática de 100 a 1000 µL y puntillas
- j) Agitadores de vidrio
- k) Vasos de precipitado de 150, 250 y 500 mL
- l) Papel parafilm
- m) Papel hidrion rango de pH de 1 a 14
- n) Papel filtro Whatman No.40 de 7 cm de diámetro
- o) Matraz bola de 250 mL
- p) Tapones de hule monohoradados
- q) Mortero y pistilo
- r) Pipetas lineales de 10 y 5mL
- s) Sistema de filtración Millipore
- t) Filtros Durapore Hidrofóbicos 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro

- u) Filtros Millipore HA 4.5 cm de diámetro y 0.45 $\mu$ m de tamaño de poro.
- v) Balanza granataria Sartorius
- w) Sistema de filtración de solventes Millipore

### 2.1.3 Reactivos

- a) Estándar de Ácido Benzoico marca Fisher 99.9%
- b) Ácido acético ( $\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) 1M pH 4.5
- c) Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 10% (v/v)
- d) Ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) al 15%
- e) Acetato de zinc ( $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ) al 30%
- f) Ácido clorhídrico (HCl) al 50%
- g) Hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 M
- h) Buffer de Fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.05 M pH 2.3

### 2.1.4 Solventes

- a) Acetonitrilo (AcN) grado HPLC
- b) Metanol (MeOH) grado HPLC
- c) Agua grado HPLC



## 2.2 Establecimiento de las condiciones de análisis de AB por CLAR

Para el establecimiento de las diferentes condiciones de análisis cromatográfico se trabajó con el estándar de AB de 60 ppm, empleando un diseño factorial en donde se mantuvo constante la fase estacionaria que fue Fase Reversa C<sub>18</sub> y la longitud de onda de detección a 230 nm. Las variaciones se realizaron en la composición de la fase móvil y la velocidad de flujo. Las fases móviles que se probaron fueron las siguientes:

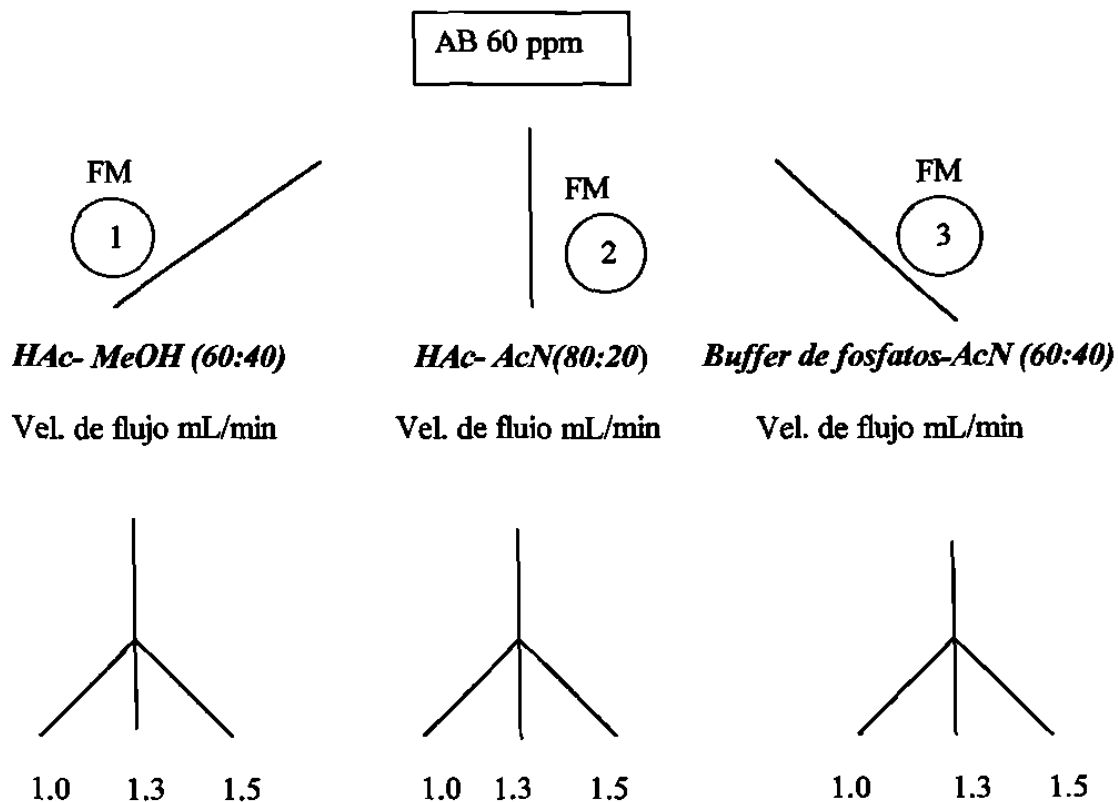
- a) HC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 1M a pH de 4.2-MeOH 60:40
- b) HC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 1M a pH de 4.5-AcN 80:20
- c) Buffer de fosfatos 0.05 M a pH de 2.3-AcN 60:40

Igualmente se probaron tres velocidades de flujo a 1.0, 1.3 y 1.5 mL/min

### 2.2.1 Diseño Factorial

El diseño Factorial que se empleó para las diferentes condiciones experimentales de análisis cromatográfico se muestra en la figura 1.

## Diseño Factorial



*\*FM: fase móvil*

Figura 1. Diseño factorial empleado para establecer las condiciones experimentales de análisis cromatográfico.

Siguiendo este diseño factorial se probaron las tres fases móviles a las tres velocidades de flujo diferentes. El estándar de 60 ppm de ácido benzoico se inyectó en cinco ocasiones bajo cada una de las diferentes condiciones de ensayo.

## 2.2.2 Evaluación de Parámetros Cromatográficos

Para seleccionar las mejores condiciones de análisis se evaluaron los siguientes parámetros: el Número de Platos Teóricos (N), el Factor de Capacidad ( $k'$ ) y el Factor de Asimetría (FA), los cuales fueron calculados a partir de los cromatogramas obtenidos por medio de las siguientes ecuaciones:

$$k' = (t_r - t_o) / t_o \quad \text{(ecuación 1)}$$

$t_o$  = tiempo muerto

$t_r$  = tiempo de retención

$$N = 5.54 (t_r / 1/2w)^2 \quad \text{(ecuación 2)}$$

$1/2w$  = ancho de base a la mitad de la altura del pico cromatográfico.

$$FA = A/B \quad \text{(ecuación 3)}$$

A = distancia medida en la base, del inicio al centro del pico.

B = distancia medida en la base, del centro al final del pico.

## **2.3 Desarrollo de un Procedimiento para la Extracción de AB en Productos Lácteos**

### **2.3.1 Análisis de leche bronca**

Antes de empezar a trabajar con las muestras comerciales de los diferentes productos lácteos se procedió a analizar una muestra de leche bronca para conocer la presencia o ausencia de AB . Esta se obtuvo mediante ordeña manual del animal, siendo depositada directamente en el recipiente recolector y almacenada a 4° C para ser procesada al día siguiente.

El desarrollo de un procedimiento para la extracción de AB en los productos lácteos se llevó a cabo en dos etapas: la primera que consistió en el tratamiento previo de la muestra y una segunda que correspondió a la extracción en fase sólida.

### **2.3.2 Tratamiento previo de la muestra**

Dos métodos de tratamiento previo fueron probados: el método I de Desproteínezación Ácida y el método II de Ultrasonido.

El método I de Desproteización Ácida consiste en: tomar 100 mL o 100 g de muestra, posteriormente homogenizar en un mortero y someter a desproteización con 15 mL de  $H_2SO_4$  al 10% más 10 mL de  $K_4Fe(CN)_6$  al 15% y 10 mL de  $Zn (C_2H_3O_2)_2$  al 30%, la mezcla se somete a reflujo por 30 min y finalmente se filtra al vacío en embudo Buchner empleando papel filtro # 40 Wathman para recuperar el filtrado y aforar a un volumen conocido.

El método II de Ultrasonido consiste en: tomar 20 mL o 20 g de muestra bien homogenizada, agregar 25 mL de NaOH 0.1 M y someter a ultrasonido por 15 minutos, enfriar y ajustar el pH a 8 con HCl al 50% , someter a desproteización por 15 min con 2 mL de ferrocianuro de potasio al 15% y 2 mL de acetato de zinc al 30% agitando después de cada adición, posteriormente filtrar al vacío sobre papel filtro Wathman # 40 y finalmente aforar a 50 mL con agua destilada.

### 2.3.3 Extracción en Fase Sólida

Los filtrados obtenidos tanto por el método de Desproteización Ácida o por el método de Ultrasonido fueron sometidos a extracción en fase sólida empleando cartuchos Sep-pack  $C_{18}$ . El proceso consiste en activar los cartuchos con 3 mL de metanol (grado HPLC), enseguida lavar con 5 mL de agua (grado HPLC), posteriormente pasar los filtrados obtenidos , volver a lavar con 5 mL de agua y finalmente eluir los componentes retenidos en el cartucho con AcN .

#### 2.3.4 Diseño Factorial

Para el establecimiento de las diferentes condiciones experimentales del tratamiento previo de la muestra y la extracción en fase sólida se empleó un Diseño Factorial trabajando con la matriz de leche, el cual constó de dos niveles representados por los dos métodos de tratamiento previo de la muestra, el de desproteínización ácida y el de ultrasonido, y dos variables que fueron el pH del filtrado y el volumen de elución del AcN. Este se muestra en la figura 2.

Para la primer variable los filtrados obtenidos tanto por el método I como por el método II de tratamiento previo de la muestra se acidificaron antes de pasarlos por el cartucho Sep-pack C<sub>18</sub> probando dos valores de pH de 1 y 3; mientras que para la segunda variable los volúmenes de elución que se probaron durante la etapa de extracción en fase sólida fueron de 1 y 3 mL de AcN.

**Diseño Factorial para establecer las condiciones de ensayo de tratamiento previo de la muestra y extracción**

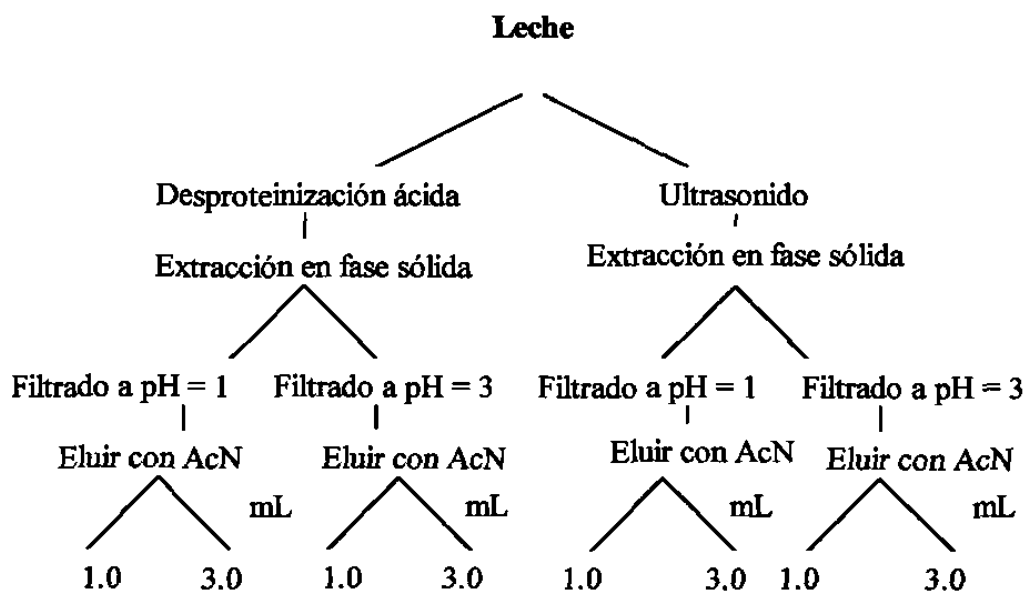


Figura 2. Diseño factorial para establecer las diferentes condiciones experimentales para el tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida.

Siguiendo este Diseño Factorial, se realizaron los diferentes ensayos de tratamiento previo de la muestra y extracción, utilizando como muestra la matriz de leche. Se emplearon para cada experimento cinco muestras en donde 2 eran muestras directas y tres muestras fortificadas con 1 mL del estándar de AB de 100 ppm. Se calculó el porcentaje de recuperación y la reproducibilidad y en base a estos dos parámetros se eligieron las mejores condiciones de tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida.

### 2.3.5 Efecto de Matriz

El método seleccionado de tratamiento previo de la muestra y extracción se aplicó al resto de las matrices (Queso tipo Petit Suisse, Queso Panela, Oaxaca, Chihuahua y Manchego) y se midió el efecto de matriz por un análisis de multivarianza MANOVA empleando el método Tukey utilizando el programa computacional ProStat . De cada matriz se realizaron 8 mediciones, de las cuales tres eran muestras directas y cinco muestras estaban fortificadas con 1 mL del estándar de AB de 100 ppm. Estas mediciones se emplearon para calcular el porcentaje de recuperación y la reproducibilidad.

## 2.4 Validación

Para validar el método desarrollado para el análisis de AB en productos lácteos se emplearon los siguientes parámetros: linealidad, precisión, límite de detección y de cuantificación, exactitud y robustez.



### 2.4.1 Linealidad

Para establecer la linealidad del método desarrollado se empleó el coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta. Se prepararon estándares de AB en la fase móvil seleccionada en el rango de 4 a 200 ppm. Se realizó el análisis cromatográfico y con los datos obtenidos se elaboró una curva de calibración, graficando la respuesta del detector en función de la concentración. Se calcularon los factores de respuesta (FR) para cada uno de los puntos de la curva empleando la ecuación 4:

$$\text{F.R.} = \text{respuesta del detector} / \text{concentración del estándar.} \quad (\text{ecuación 4})$$

Para nuestro caso la respuesta del detector correspondió al área del pico.

Una vez obtenidos los FR en cada uno de los puntos de la curva de calibración se calculó el coeficiente de variación (CV), con la ecuación 5:

$$\text{CV} = (\text{SD} \times 100) / \overline{\text{X}} \text{ de los FR} \quad (\text{ecuación 5})$$

Donde:

CV = Por ciento del coeficiente de variación

SD = Desviación estándar de los factores de respuesta (calculada empleando el programa

Microsoft excel).

$\overline{\text{X}}$  = Promedio de los factores de respuesta

## 2.4.2 Precisión

La precisión se evaluó tanto para el sistema como para el método desarrollado.

### 2.4.2.1 Precisión del sistema

Para determinar la precisión del sistema se empleó el estándar de AB de 60 ppm el cual se inyectó en el cromatógrafo bajo las condiciones cromatográficas previamente seleccionadas, en 5 ocasiones consecutivas y en tres días diferentes. De los cromatogramas obtenidos se tomaron los datos de tiempo de retención y área del pico cromatográfico.

Con los 15 datos obtenidos tanto del tiempo de retención como del área del pico se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación haciendo uso del programa *Microsoft excel*.

### 2.4.2.2 Precisión del método

Para medir la precisión del método se tomaron cinco muestras de un producto lácteo en donde no se observó efecto de matriz y se procesaron de acuerdo con el método de tratamiento previo y extracción seleccionados. Estas muestras se inyectaron en el aparato y de los cromatogramas resultantes se tomaron los datos de tiempo de retención y área del pico.

Los datos obtenidos se emplearon para el cálculo del promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación empleando también el programa Microsoft excel.

### 2.4.3 Límite de detección

El límite de detección del método desarrollado se determinó basándonos en el método descrito por Quattrocchi y que consiste en: considerar tres veces el error estándar en el eje de las “y” que corresponde a la desviación estándar de la respuesta a concentración cero empleando la ecuación:

$$\text{Límite de detección} = Y_{bl} + 3(S_{bl} / b) \quad (\text{ecuación 6})$$

Donde:

$b$  = Corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

$Y_{bl}$  = Se obtuvo corriendo otra curva de calibración con los estándares de la zona inferior de la curva de calibración que fueron de 2, 4 y 6 ppm de AB, inyectando cada uno por triplicado, determinando la ecuación de esta nueva recta y extrapolando la respuesta a concentración cero.

$S_{bl}$  = Corresponde a la desviación estándar del blanco, la cual se determinó calculando la desviación estándar de las áreas a cada concentración de la curva anterior y corriendo una

nueva curva de calibración, considerando la concentración como “x”, la desviación estándar como “y”, y  $S_{bl}$  correspondió al intercepto.

#### 2.4.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de nuestro método fue obtenido considerando 10 veces el error estándar en el eje de las “y” que corresponde a la desviación estándar de la respuesta a concentración cero, empleando la ecuación 7 :

$$\text{Límite de cuantificación} = Y_{bl} + (10S_{bl} / b) \quad (\text{ecuación 7})$$

Cada uno de los datos de esta ecuación son los mismos que para la ecuación 5 sólo que en este caso se considera 10 veces el error estándar en el eje de las “y” (Quattrocchi Oscar Alberto. 1992).

#### 2.4.5 Exactitud

La exactitud se obtuvo en base al porcentaje de recuperación. Para determinarla se trabajó con una matriz en la que no se observó efecto de matriz. Se tomaron ocho muestras de este producto lácteo , tres fueron muestras directas y cinco de ellas se contaminaron con 1 mL del estándar de AB de 100 ppm. Al mismo tiempo se corrió el estándar de 100 ppm

para con los datos obtenidos de las áreas de los picos poder calcular el porcentaje de recuperación aplicando la ecuación 8:

$$\% \text{ de recuperación} = (A.M.C. - A.M.S.C) 100 / A.St \quad (\text{ecuación 8})$$

Donde:

A.M.C. = Promedio de las áreas de las muestras contaminadas.

A.M.S.C. = Promedio de las áreas de las muestras sin contaminar.

A.St. = Promedio de las áreas del estándar.

Las muestras fueron tratadas por el método de tratamiento previo y extracción desarrollado y corridas bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

#### 2.4.6 Robustez

Para medir la Robustez de nuestro método como parámetro de validación se realizaron pequeños cambios tanto en la composición de la fase móvil como en el pH del HAc. La tabla I muestra los cambios que se realizaron en estas dos variables para evaluar la Robustez.

Tabla I.- Cambios en la composición de la fase móvil y el pH del HAc 1M durante la Robustez.

<b>Variables modificadas</b>	<b>Condiciones establecidas</b>	<b>Cambio 1</b>	<b>Cambio 2</b>
<b>Composición de *FM</b>	HAc 1M-AcN 80:20	HAc 1M-AcN 75:25	HAc 1M-AcN 85:25
<b>pH HAc 1 M</b>	4.5	4.3	4.7

\* FM: Fase Móvil.

El estándar de AB de 60 ppm, se inyectó en 5 ocasiones consecutivas bajo cada uno de los diferentes cambios realizados , así como también en las condiciones ya establecidas.

En cada uno de los picos cromatográficos resultantes con estos cambios en las condiciones cromatograficas se calculó el factor de capacidad (ecuación 1), el número de platos teóricos (ecuación 2 ) y el factor de asimetría (ecuación 3 ).

Los nuevos parámetros obtenidos con los pequeños cambios realizados tanto en la composición de la fase móvil como en el pH del HAc 1M se compararon con los obtenidos bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas empleando una prueba t de Student y de esta manera se midió si estos pequeños cambios en ambas variables causaban diferencias estadísticamente significativas.

## **2.5 Determinación de los niveles de AB en leche y quesos**

### **2.5.1 Selección de muestras**

En el planteamiento inicial se decidió determinar los niveles de AB en aquellos productos lácteos de mayor consumo entre la población del área metropolitana de Monterrey resultando: la leche pasteurizada, el queso Pettit suisse, el queso Panela, el queso Oaxaca, el queso Chihuahua y el queso Manchego. De cada uno de estos productos existen numerosas marcas por lo que se eligió la marca más vendida en base a datos de inventario proporcionados por una gran cadena comercial del área metropolitana de Monterrey. Se colectaron 10 muestras al azar de cada uno de los productos lácteos a analizar de diferentes establecimientos comerciales, corroborando que correspondían a diferentes lotes.

### **2.5.2 Procesamiento de las muestras**

Las muestras se procesaron aplicando el método seleccionado de tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida, y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos trabajando bajo las condiciones previamente establecidas.

Los niveles de AB de cada uno de los diferentes productos lácteos fueron reportados en ppm.



## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Condiciones cromatográficas**

La tabla II muestra los resultados de los parámetros cromatográficos obtenidos bajo las diferentes condiciones experimentales establecidas empleando el diseño factorial para el análisis de AB por CLAR. Los resultados muestran que la mayor eficiencia se logró empleando como fase móvil HAc (1 M pH 4.5) – AcN 80 : 20 a una velocidad de flujo de 1.3 mL/min, como fase estacionaria una columna fase reversa C<sub>18</sub> y detección a 230 nm . Estas fueron las condiciones cromatográficas seleccionadas para llevar acabo el trabajo experimental.

TABLA II.- Selección de condiciones cromatográficas para el análisis de AB.\*

FASE MÓVIL	HAc (1M pH 4.5 )- MeOH 60:40			HAc (1M pH 4.5 ) – AcN 80:20			Buffer fosfatos (0.05 M pH 2.3) – AcN 60:40		
Vel. de flujo mL/min Parámetros	1.0	1.3	1.5	1.0	1.3	1.5	1.0	1.3	1.5
tr	4.27	3.34	2.70	4.85	3.36	3.05	2.83	2.16	1.87
N	9,680	9,426	4,469	10,628	11,577	4,986	1,903	2,443	1,795
k'	1.50	1.62	1.62	1.61	2.17	1.50	0.82	0.79	0.78
FA	0.46	0.46	0.45	0.70	0.71	0.56	0.53	0.29	0.36

\*n = 5

### 3.2 Tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida

#### 3.2 Análisis de Leche Bronca

La figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos tanto del estándar de AB de 60 ppm como de la leche bronca. En el cromatograma a se observa la señal de AB a un tiempo de retención de 2.9 min, mientras que para la leche bronca no hay señal detectable para el AB.

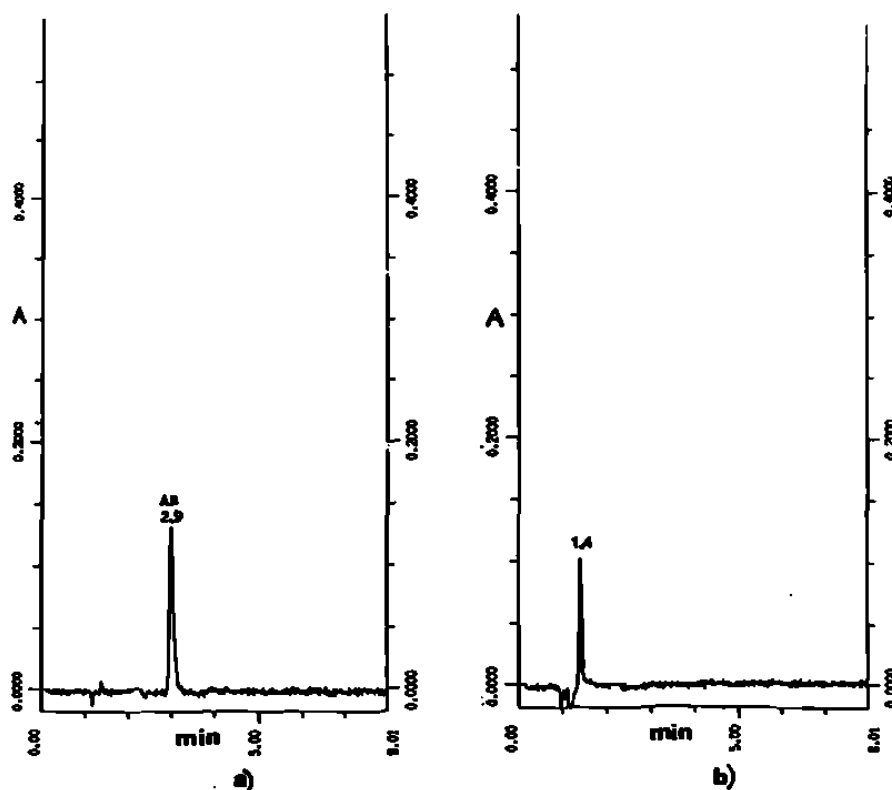


Figura 3. Cromatogramas de: a) estándar de AB de 60 ppm y b) leche bronca. Fase móvil HAc (1M pH 4.5)-AcN 80: 20, fase estacionaria columna  $C_{18}$  fase reversa , flujo 1.3 mL/ min y detección a 230 nm.

### 3.2.2 Porcentajes de recuperación

En la tabla III se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos trabajando la matriz de leche bajo las diferentes condiciones experimentales de tratamiento previo y extracción establecidas con el diseño factorial. Los mejores porcentajes de recuperación se observaron tratando la muestra con el método de ultrasonido, acidificando el filtrado de la muestra a pH de 1 y utilizando 1 mL de AcN para la extracción.

Tabla III.- Porcentajes de recuperación en la matriz de leche\*.

Método / Condiciones	Desproteínización ácida				Ultrasonido			
	1		3		1		3	
pH	1		3		1		3	
AcN (mL)	1	3	1	3	1	3	1	3
<b>% Recuperación</b>	12.02	17.04	9.43	14.08	<b>67.59</b>	42.91	57.08	32.06
<b>SD</b>	0.59	0.11	0.18	0.26	<b>0.52</b>	0.47	0.32	0.17
<b>CV</b>	20.91	8.55	8.36	23.99	<b>3.26</b>	13.57	2.44	7.04

\*n = 3

Considerando estos resultados el método desarrollado de tratamiento previo y extracción de la muestra fue el siguiente:

a) Tratamiento previo de la muestra

- Pesar de 20 g del producto lácteo
- Homogenizar en un mortero
- Transferir a un vaso de precipitados de 150 mL lavando las paredes con agua
- Añadir 25 mL de NaOH 0.1 M
- Colocar en baño de ultrasonido por 15 min.
- Dejar enfriar
- Ajustar el pH a 8 con HCl al 50%

- Agregar 2 mL de ferrocianuro de potasio al 15 % y agitar
- Añadir 2 mL de acetato de zinc al 30% y agitar
- Reposar por 15 min
- Filtrar a vacío en embudo Buchner empleando papel filtro Wathman # 42
- Acidificar el filtrado a pH de 1 con HCl al 50%
- Aforar con agua grado HPLC a 50 mL

b) Extracción en cartuchos Sep-pack C<sub>18</sub>

- Activar el cartucho con 3 mL de metanol grado HPLC
- Pasar 5 mL de agua grado HPLC
- Pasar toda la muestra (50 mL)
- Lavar con 5 mL de agua grado HPLC
- Eluir con 1mL de AcN
- Filtrar empleando sistema millipore

### 3.2.3 Efecto de matriz

Los porcentajes de recuperación obtenidos en las diferentes matrices tratadas con el método desarrollado de tratamiento previo y extracción se muestran en la tabla IV. En esta misma tabla se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de matriz empleando el método Tuckey. No se observó efecto de matriz para el queso

Panela y el queso tipo Petit suisse. Los coeficientes de variación en todas las matrices fueron menores al 10%.

Tabla IV.- Porcentajes de recuperación en diferentes matrices \* .

<b>Matriz</b>	<b>% de Recuperación</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>	<b>Método Tuckey (95%)</b>	<b>Rango crítico</b>
<b>Queso Panela</b>	<i>63.471</i>	3.923	6.180	<u>5.424</u>	7.021
<b>Queso Petit Suisse</b>	<i>65.987</i>	5.615	8.509	<u>2.098</u>	7.021
<b>Queso Oaxaca</b>	<i>44.105</i>	1.714	3.888	24.790	7.021
<b>Queso Chihuahua</b>	<i>42.140</i>	3.533	8.385	26.754	7.021
<b>Queso Manchego</b>	<i>31.509</i>	3030	9.617	37.386	7.021

\*n = 5

### 3.3 Parámetros de Validación

#### 3.3.1 Linealidad, límites de detección y cuantificación

3.3.2 En la figura 4 se muestra la curva de calibración para el AB, en donde se observa que fue lineal en el rango de 4 a 140 ppm presentando un coeficiente de correlación lineal de 0.9956 con un factor de respuesta promedio de 0.2737 y un coeficiente de variación de 15.00%. El límite de detección fue de 2.00 ppm mientras que el de cuantificación se estableció en 3.11 ppm.

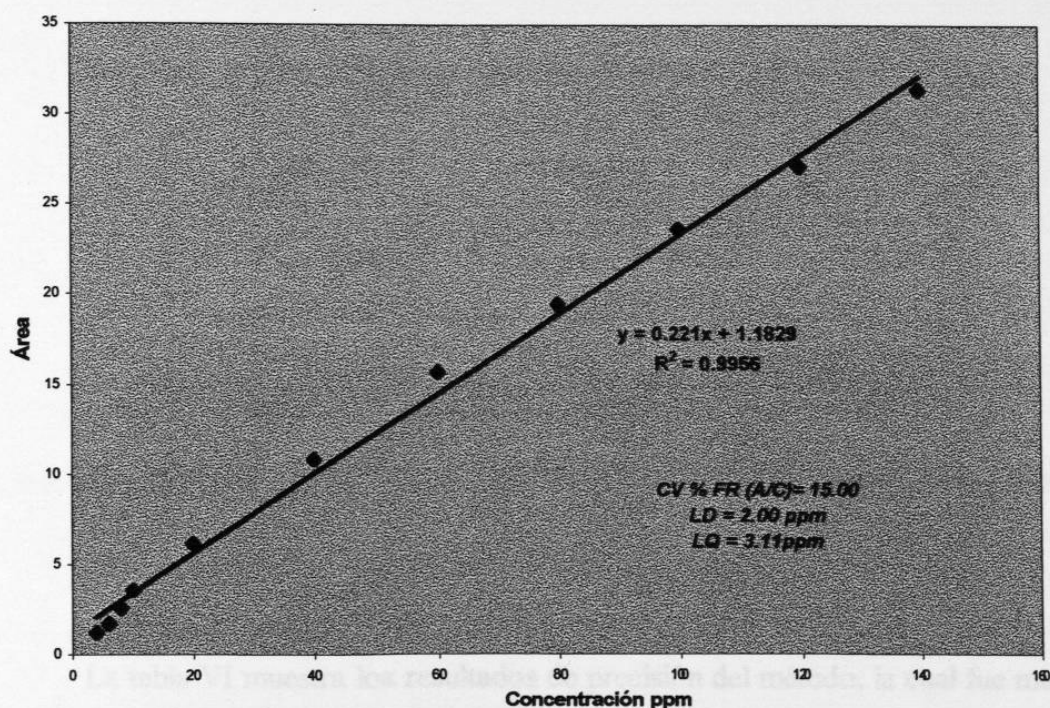


Figura 4. Curva de calibración del ácido benzoico.

### 3.3.2 Precisión y exactitud

El pico del AB tuvo un tiempo de retención promedio de 2.99 con una desviación estándar de 0.0083 y un coeficiente de variación de 0.278. La precisión también se calculó en función del área, que fue el parámetro empleado para la cuantificación, presentando una desviación estándar de 0.619 y un coeficiente de variación de 3.81. Estos datos se muestran en la tabla V.

Tabla V.- Precisión del sistema cromatográfico.\*

	<b>tr (min)</b>	<b>Área</b>
<b><math>\bar{X}</math></b>	2.99	16.238
<b>SD</b>	0.0083	0.619
<b>CV</b>	0.278	3.81

\*n = 15

La tabla VI muestra los resultados de precisión del método, la cual fue medida en una muestra donde no hubo efecto de matriz. La desviación estándar del tiempo de retención fue de 0.004 con un coeficiente de variación de 0.169, mientras que el área presentó una desviación estándar de 9.859 y un coeficiente de variación de 5.969.



Tabla VI.- Evaluación de la precisión del método.\*

	<b>tr (min)</b>	<b>Área</b>
<b><math>\bar{X}</math></b>	2.847	165.155
<b>SD</b>	0.004	9.859
<b>CV</b>	0.169	5.969

\*n = 10

La exactitud del método se midió en base al porcentaje de recuperación y fue del 65.98 %. Esta exactitud también fue calculada en una muestra en donde no se observó efecto de matriz.

### 3.3.3 Robustez

En la tabla VII se muestran los resultados de los parámetros cromatográficos obtenidos al realizar pequeños cambios tanto en la composición de la fase móvil como en el pH del ácido acético. Al comparar estos resultados con los parámetros obtenidos bajo las condiciones ya establecidas empleando una t de Student ( $p < 0.05$ ) se observó una diferencia estadísticamente significativa en todos ellos. Es decir, pequeños cambios tanto en la composición de la fase móvil como en el pH del ácido acético tienen influencia significativa sobre el resultado.

Tabla VII.- Resultados de Robustez.\*

<b>Parámetros</b>	<b>Cambio en composición de FM</b>		<b>Cambio en pH de HAc</b>		<b>Condiciones establecidas</b>
	<b>HAc-AcN 75:15</b>	<b>HAc-AcN 85:15</b>	<b>pH= 4.3</b>	<b>pH = 4.7</b>	
	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>HAc (1M pH=4.5)- AcN 80: 20</b>
<b>tr</b>	2.15	4.13	3.12	2.29	2.83
<b>N</b>	1,862.80	3,041.27	2,505.21	2,101.47	3,216.47
<b>FA</b>	0.21	0.25	0.25	0.20	0.25
<b>k'</b>	0.53	1.87	1.21	0.59	1.01
<b>Área</b>	18.30	15.18	15.43	21.70	17.47

\*n = 5 (p < 0.05)

### 3.4 Niveles de AB en leche y quesos

Los niveles de AB determinados en leche y queso se muestran en la tabla VIII. En la leche analizada no se detectó señal de AB. Los coeficientes de variación en todos los casos fueron menores del 20%.

Tabla VIII. Niveles de AB en leche y quesos.\*

<b>Producto</b>	<b><math>\bar{X} \pm 2 \text{ SD (ppm)}</math></b>	<b>CV</b>
<b>Leche</b>	ND	-----
<b>Petit suisse</b>	1,124.40 $\pm$ 19.70	5.96
<b>Queso Panela</b>	67.54 $\pm$ 30.58	15.29
<b>Queso Oaxaca</b>	40.81 $\pm$ 1.16	11.30
<b>Queso Chihuahua</b>	173.97 $\pm$ 3.22	9.31
<b>Queso Manchego</b>	209.87 $\pm$ 4.54	14.39

\*n = 10

(ND: No detectable)

En la figura 5 se muestran los cromatogramas obtenidos de cada uno de los productos lácteos donde se observa que la señal del AB aparece a un tiempo de retención de 2.8 minutos y que no hubo interferencia de matriz en ninguno de ellos.

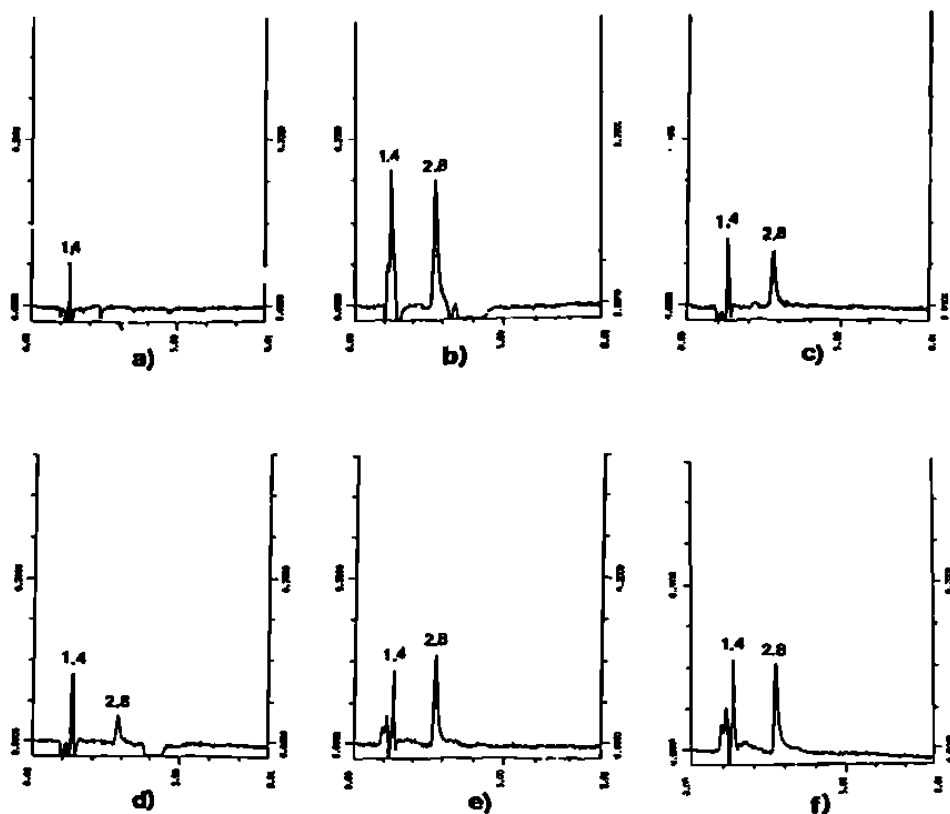


Figura 5. Cromatogramas de productos lácteos : a) leche ,b) Queso Petit suisse dilución 1:5, c) Queso Panela, d)Queso Oaxaca, e) Queso Chihuahua y f) Queso Manchego (El eje de las ordenadas corresponde a la absorbancia y el de las abcisas al tiempo en minutos). Tiempo de retención de AB 2.8 min.

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN**

#### **4.1 Condiciones cromatográficas**

##### **4.1.1 Calculo de N**

Para el cálculo del número de platos teóricos a partir de los picos cromatográficos se decidió emplear la ecuación  $N = 5.54 (t_r/1/2 w)^2$  considerando la base a la mitad de la altura del pico ( $1/2 w$ ) para de esta manera uniformizar y eliminar el ligero efecto de coleo observado en algunos de los picos cromatográficos (García de Marina. *Cromatografía Líquida de Alta Resolución* 1988).

#### 4.1.2 Selección de velocidades de flujo

En una primera etapa se probaron las siguientes velocidades de flujo: de 1.0, 1.5 y 2.0 mL/min empleando como fase móvil  $\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{-MeOH}$  60:40, inyectando el estándar de AB de 60 ppm en 5 ocasiones consecutivas a las tres velocidades propuestas; sin embargo al calcular los parámetros de eficiencia como son el número de platos teóricos (N), el factor de capacidad ( $k'$ ) y el factor de asimetría (FA), se observó que para la velocidad de flujo de 2.0 mL/min el número de platos teóricos disminuía mucho con respecto a las anteriores, por lo que se decidió eliminar ésta e incluir una intermedia entre 1.0 y 1.5 mL/min la cual fue de 1.3 mL/min. Estos resultados se muestran en la tabla IX.

Tabla IX.- Cálculo de N a las tres velocidades propuestas inicialmente\*.

<b>Vel. de flujo</b> <b>Parámetros</b>	<b>1.0 mL/min</b>	<b>1.5 mL/min</b>	<b>2.0 mL/min</b>
<b>N</b>	8,100	4,469	1,601
<b>k'</b>	1.72	1.10	1.04
<b>FA</b>	0.33	0.5	0.5

\*n = 5

### 4.1.3 Selección de la fase móvil

Las condiciones de análisis cromatográfico seleccionadas para la determinación del AB fueron: como fase móvil  $\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  (1M pH 4.5)-AcN 80:20, a una velocidad de flujo de 1.3 mL/min, ya que bajo estas condiciones se obtuvo el mayor N y el mejor FA y  $k'$ ; sin embargo los picos cromatográficos obtenidos empleando como fase móvil Buffer de fosfatos-AcN 60:40 fueron muy intensos como se observa en la figura 5, lo que representa una mayor sensibilidad, pero los parámetros de eficiencia como  $k'$  y N eran más bajos, con respecto a la fase móvil HAc (1M pH 4.5)-AcN 80:20.

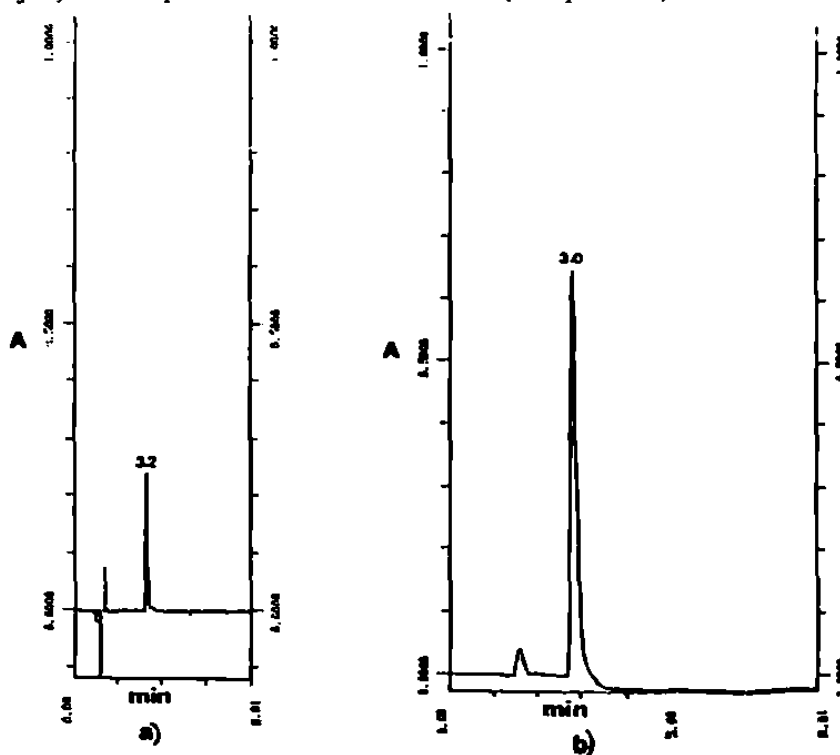


Figura 6. Cromatogramas del estándar de AB. Concentración 60 ppm, fase móvil: a) HAc (1 M pH 4.5)-AcN 80:20 y b) Buffer fosfatos-AcN 60:40.

Para verificar si la eficiencia mejoraba con la fase móvil de buffer de fosfatos se probaron dos velocidades de flujo más que fueron de 0.9 y 0.8 mL/min. Se inyectó en 5 ocasiones consecutivas el estándar de 60 ppm a ambas velocidades propuestas; sin embargo al calcular los parámetros (N, k' y FA) a partir de los picos cromatográficos no se observó mejoría en la eficiencia como se puede observar en la tabla X.

Tabla X. Resultados con fase móvil de Buffer de fosfatos (0.05 M pH 2.3)- AcN 60:40.\*

<b>Vel de flujo (mL/min)</b>	<b>N</b>	<b>k'</b>	<b>FA</b>
<b>0.8</b>	2,304	0.89	0.16
<b>0.9</b>	4096	0.88	0.20
<b>1.0</b>	1490	0.82	0.53

\*n = 5

El pH de esta fase móvil es de 3.0 lo cual no es deseable para la vida media de la columna ya que la acorta, además, el hecho de trabajar con buffer implica mayores cuidados con el cromatógrafo, sobre todo una minuciosa limpieza del equipo.

Durante la validación de un método existe tanto un compromiso en la sensibilidad como en la eficiencia; decidimos sacrificar la sensibilidad obtenida con el empleo del buffer de fosfatos como fase móvil por la eficiencia obtenida con el HAC (1M pH 4.5)-AcN 80:20; además, bajo estas condiciones cromatográficas es posible



detectar y cuantificar adecuadamente los niveles de AB esperados en nuestras muestras problema.

## **4.2 Tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida**

### **4.2.1 Análisis de leche bronca**

Los resultados del análisis de la leche bronca nos confirman la ausencia de AB de manera natural en este producto. Esto nos permitió tener la seguridad que la señal detectada en los diferentes productos lácteos era debida solo al AB adicionado durante el proceso de fabricación.

### **4.2.2 Método de tratamiento previo de la muestra**

Para el desarrollo del tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida se decidió probar las condiciones experimentales utilizando como muestra la leche.

Se probaron dos métodos de tratamiento previo: el método de desproteínización ácida ( Terada Hysaya. *Journal of Chromatography*. 1985) y el de ultrasonido (Riva Reyro 1987, Torres Caio Cesar. *Acta Amazonica*. 1990).

El método de desproteínización ácida presentó la ventaja de que no se requirió equipo especial para llevarla a cabo; sin embargo su recuperación fue baja (menor del 20%) para este tipo de alimentos; esto debido al  $H_2SO_4$  y el calor los cuales probablemente destruyeron el AB. Además presentó otras desventajas con respecto al método de ultrasonido como fueron: el requerimiento de una mayor cantidad de muestra, el riesgo existente por el empleo de un ácido fuerte ( $H_2SO_4$ ), una mayor inversión de tiempo, una mayor manipulación de la muestra lo que se refleja en los bajos porcentajes de recuperación obtenidos; así también, los filtrados obtenidos por este método con este tipo de matrices eran turbios, lo cual hacía más lenta y difícil la extracción en los cartuchos Sep-pack  $C_{18}$ , debido a que estos se tapaban.

El método de ultrasonido resultó ser un método rápido, sencillo y reproducible, que además mejoró la recuperación de 4 a 6 veces con respecto al método de desproteínización ácida. Así mismo, los filtrados obtenidos por este método no presentaban turbidez, no existió un riesgo por el manejo de ácidos y la muestra requerida fue más pequeña (20 g).

### 4.2.3 Extracción en fase sólida

En una primera etapa de nuestro trabajo experimental se había decidido probar dos solventes de elución: el AcN por un lado y la fase móvil seleccionada de HAc (1M pH 4.5)-AcN por el otro. Durante los primeros experimentos eluyendo con fase móvil, no se observó señal del AB en los cromatogramas, lo cual sugirió que ésta no tenía la suficiente fuerza de elución para arrastrar el AB retenido en el cartucho. Esto fue confirmado eluyendo nuevamente estos mismos cartuchos con AcN e inyectando posteriormente en el cromatógrafo. Al analizar los cromatogramas se observó la señal del AB, por lo que se decidió eliminar el uso de la fase móvil para eluir el AB retenido en el cartucho Sep-pack C<sub>18</sub>.

Durante la extracción en fase sólida se acidificó el filtrado de la muestra probando dos pH 1 y 3. Estos se seleccionaron en función del pK del ácido benzoico el cual es de 4.2 (The Merck Index 1976), buscando tener la mayor proporción del AB en su forma no disociada, y así aumentar la recuperación durante la elución que resultó mejor a pH de 1. También se probaron dos volúmenes de AcN durante la elución que fueron de 1 y 3 mL. Se observó que había mejor recuperación si la elución se realizaba empleando 1 mL de AcN y no 3 mL, ya que durante la elución con 3mL, el eluato obtenido era turbio. Para eliminar esta turbidez se adicionó 0.2 mL de HCl al 50% y posteriormente se filtró a través de filtros Millipore (0.22 $\mu$ m GVH) y finalmente se

inyectó en el cromatógrafo. Con toda esta manipulación creemos que podríamos estar perdiendo parte del AB.

#### 4.2.4 Efecto de matriz

El efecto de matriz se midió durante el tratamiento previo de la muestra y extracción por un análisis de comparación múltiple empleando el método Tukey. Este es un procedimiento estadístico que se utiliza para probar la igualdad de todos los posibles pares de medias siempre y cuando todas las muestras sean del mismo tamaño (Wayne W. Daniel 1997).

Los resultados del efecto de matriz mostraron que, para el queso Panela y el queso tipo Petit suisse, no hubo diferencia estadísticamente significativa, entre la matriz de leche y los quesos mencionados; sin embargo, para el resto de las matrices sí se observó este efecto. Es importante mencionar que, a pesar de esto, los coeficientes de variación en todas las matrices fueron menores al 10%. El efecto de matriz observado en las muestras de queso Oaxaca, Chihuahua y Manchego (Tabla IV) creemos que puede deberse al alto contenido en grasas, característica común de estos productos. El bajo coeficiente de variación nos permitió determinar adecuadamente los niveles de AB. Para ello se calculó y aplicó el factor de corrección en base al porcentaje de recuperación obtenido para cada tipo de matriz.

En los quesos Oaxaca, Chihuahua y Manchego consideramos que lo que podría estar sucediendo es que el AB quedó encapsulado en las moléculas de grasa, de tal manera que no fue posible extraerlo, por lo que creemos que si se probara aumentando el tiempo de ultrasonido así como la concentración del NaOH se podría mejorar la recuperación. Es importante mencionar que, en caso de aumentar la concentración del NaOH los precipitados tendrían que ser lavados posteriormente con HCl diluido para asegurar la forma ácida del AB, ya que la sal podría quedar atrapada en el precipitado durante la filtración.

### 4.3 Validación

#### 4.3.1 Linealidad y límites de detección

Para establecer la linealidad del método además de la curva de calibración y su coeficiente de correlación lineal, se empleó un parámetro más fino, que es el factor de respuesta (FR), el cual representa la relación del área del pico sobre la concentración. La EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente) considera que el factor de respuesta es un parámetro más sensible de la linealidad siempre y cuando el coeficiente de variación de este factor se mantenga debajo de un 20%; lo cual se cumplió en nuestro caso. El rango de linealidad que obtuvimos, que fue de 4 a 140 ppm, nos permitió cuantificar los niveles de AB en nuestras muestras problemas.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos por nuestro método permiten *detectar y cuantificar adecuadamente* los niveles esperados de ácido benzoico en las muestras problema.

#### 4.3.2 Precisión y exactitud

El tiempo de retención de AB como estándar fue ligeramente diferente al tiempo de retención de AB en la muestra, esto debido a un efecto de matriz. Sin embargo, fueron constantes de manera que se obtuvieron CV menores del 10%.

Estos resultados de precisión tanto del sistema como del método nos permitieron cuantificar correctamente los niveles de AB en los diferentes productos lácteos; aún cuando la recuperación del método fue del 65.98%.

#### 4.3.3 Robustez

La Robustez de un método indica el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Nuestros resultados de robustez arrojan que ligeros cambios en la composición de la fase móvil, en particular en la relación de los solventes

así como en el pH del HAc, producen cambios significativos en la eficiencia del método, por lo que es importante controlar estos parámetros.

#### 4.4 Niveles de AB

Dentro de los productos lácteos seleccionados para determinar los niveles de AB está la leche fresca. En la actualidad este producto presenta fechas de vencimiento muy amplias por lo que decidimos verificar la ausencia de AB. La Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994 prohíbe la adición de cualquier conservador a la leche fresca para aumentar su tiempo de vida en anaquel.

En la leche fresca que se analizó no se observó señal de AB.

Los quesos Panela, Oaxaca, Chihuahua y Manchego que se seleccionaron por ser los de mayor consumo por la población, presentaron niveles de AB dentro de los límites establecidos por las Normas. Sin embargo en el queso tipo Petit suisse, de alto consumo en la población infantil, se encontraron concentraciones de AB 1,124.40 ppm (0.27 %), valor que sobrepasa la concentración máxima permisible de este conservador en alimentos que es de 0.05 a 0.10 %. Este producto es consumido principalmente por infantes, pero las concentraciones máximas permisibles son calculadas en base a la dosis de referencia oral (RfD) la cual se establece considerando un adulto de 70 Kg ; por lo

tanto las concentraciones de AB encontradas en el queso tipo Petit Suisse son muy superiores a la RfD. Es importante considerar este hallazgo que podría causar problemas de salud en la población infantil.



## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

#### 5.1 Conclusiones

1.- Se validó el método cromatográfico para el análisis de AB en productos lácteos bajo las siguientes condiciones:

- a) Tratamiento previo de la muestra con ultrasonido seguido de extracción en fase sólida a pH de 1 y elución del cartucho con 1 mL de AcN.
- b) Condiciones cromatográficas:
  - Fase móvil: HAc (1 M pH = 4,5)-AcN 80:20
  - Velocidad de flujo: 1.3 mL/ min
  - Fase estacionaria: columna fase reversa C18 de dimensiones 150 mm x 4.6 mm x 5 $\mu$ m .
  - Detección: 230 nm

2.- Se observó efecto de matriz con el método desarrollado de extracción de AB en el queso Oaxaca, Chihuahua y Manchego.

3.- Los niveles de AB determinados en los diferentes productos lácteos están dentro de las concentraciones permitidas excepto para el queso tipo Petit suisse.

## **5.2 Recomendación**

Para aumentar el porcentaje de recuperación en quesos con alto contenido de grasa se sugiere modificar el método de tratamiento previo.

## BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. AOAC Oficial Meted 994.11 Benzoic Acid in Orange Juice. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16 th edition. Volumen II (37), 22-23. March 1998.
- Badui Dergal S.. Química de los Alimentos, 3ª edición. Ed. Addison-Wesley Longman. México, 1999. pp 455-463.
- Callul M., Marce R. M., Sánchez G. and Borull F.. Determiration of Additives in Wine by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography. 607 (2), 339-347. 1992.
- Delaney M. F., Kathleen M. P, Mauro D. M., Gsell D. S. and Korologos P. C.. Determination of Aspartame, Caffeine, Saccharin and Benzoic Acid in Beverages by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Chemical Education. 62 (7), 618-620. 1985.
- FDA (Administración de Alimentos y Drogas). Evaluation of the Healt Aspect of Benzoic Acid and Sodium Benzoate as Food Ingredients. DHEW, Waashington, D.C.. Report No. SCGS-7. NTIS PB-223 837/6. 1973.
- Fomon Samuel J.. Nutrición del Lactante, 1ª edición. Ed. Mosby/Doyman Libros. España, 1995. pp 120-208.
- Frazier W.C., Westhoff D.C.. Microbiología de los Alimentos, 4ª edición. Ed. Acribia. España, 1993. pp 191-197.
- García de Marina A., Del Castillo B.. Cromatografía Líquida de Alta Resolución, 1ª edición. Ed. Trillas. México, 1988. pp 38-42.
- Hannisdal A.. Analysis of Acesulfame-K, Saccharin, and Preservatives in Beverages and Jams by HPLC. Z. Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung. 194 (6), 517-519. 1992.
- Ir Meyer Marco R.. Elaboración de Productos Lácteos, 1ª edición. Ed. Trillas. México, 1983. pp 59-60.
- Kantasubrata J. and Imamkhasani S.. Análisis of Additives in Fruit Juice Using HPLC. ASEAN Food Journal. 6 (4), 155-158. 1991.
- Kirk R. S., Sawyer R., Egan H.. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson, 2ª edición. Ed. Continental S.A. de C.V.. México, 1996. pp 70-76, 663-666.
- Larousse. Diccionario Enciclopédico 2000, 6ª edición. Agrupación Editorial, S.A.. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia, 2000.
- Mallinckrodt J.T.. Sodium Benzoate. Baker. MSDS Material Safety Data Sheet, 1999. <http://www.jt.com/msds/s2930.htm>.

- Mannino S. And Cosio M.S. Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Food by Microdialysis Sampling Coupled with HPLC and UV Detection. *Ital J. Food Science.* 8 (4), 311-316. 1996.
- Mihyar Ghadeer F., Yousif Ali K. and Yumani Mohamed I.. Determination of Benzoic and Sorbic Acid in Labaneh by High Performance Chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis.* 12 (1), 53-61. 1999.
- Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Leche Pasteurizada de Vaca. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias. México, 1994.
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Quesos:Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias. México, 1994.
- Pascual Anderson M. Del R., Calderón y Pascual V..Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, 2ª edición. Ed. Díaz de Santos S.A.. Madrid, 2000. pp 281-290.
- Potter Norman N.. La Ciencia de los Alimentos, 1ª edición. Ed. Edutex, S.A..México, 1973. pp 379-398.
- Prostat User's Hand Book. 1a edición. Poly Software International. USA, 1996. pp 153-158.
- Quattrocchi Oscar A., De Andrizzi Sara A. y Laba Raul F.. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A.. Buenos Aires, 1992. pp 39-64, 301-328.
- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. *Diario Oficial de la Federación.* México, 18 de enero de 1988.
- Riva Reyero M. C.. Detección de Ácido Benzoico en Leche y Productos Lácteos. *Alimentaria.* 57, 57-62. Marzo de 1987.
- Robach M.C.. Use of Preservatives to Control Microorganisms in Foods. *Food Techno.* 34 (10), 80-83. 1980.
- Sewell P. A., Clarke B.. Chromatographic Separations. Analytical Chemistry by Open Learning, 1a edición. Ed. John Wiley and Sons. Great Britain, 1987. pp 1-103.
- Suárez M.A., Masferrer D., Vázquez L., Centrich F.. Análisis de Aditivos en Bebidas Refrescantes. *Alimentaria.* 35 (279), 43-48. 1997.
- Terada H. And Sakabe Yoshio.. Studies on the Analysis of Food Additives by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography.* 346 (0), 333-340. 1985.
- The Merck Index and Encyclopedia of Chemicals and Drugs, ninth edition. Merck and Co., INC, 1976. pp 1095.

- Torres Caio C., Branda o Sebastiao C. Determinacao de Ácido Benzoico e Ácido Sórbico em Iogurtes Comerciais. *Acta Amazonica*. 20 (0), 331-340. 1990.
- U.S.E.P.A.. Benzoic Acid. CASRN 65-85-0 IRIS (Integrated Risk Information System), 1988. <http://www.epa.gov/iris/subst/0355.htm>.
- U.S.E.P.A.. Health and Environmental Effects Document for Benzoic Acid. Healt and Enviromental Assessment. Enviromental Criteria and Assessment Office. Cincinati OH. for the office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC., 1987.
- Valle Vega P. Toxicología de Alimentos, 2ª edición. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Mundial de la Salud. México, 1991. pp 39-42.
- Wayne W. Daniel. Bioestadística, 3a edición. Ed. Limusa. México, 1997. pp 345-397.



