

CARACTERISTICAS HIGIENICO-SANITARIAS DE LOS CHACINADOS DE CONSUMO EN LA CAPITAL FEDERAL Y GRAN BUENOS AIRES.



INTI/CLD
2066

Y I Parte: Estudios realizados sobre salchichas tipo viena, envasadas y sueltas.

En este trabajo presentamos las primeras conclusiones de una investigación sobre las condiciones higiénico-sanitarias de los chacinados de consumo en la Capital Federal y gran Buenos Aires.

Esta investigación fue realizada por iniciativa de la Secretaría de Salud Pública, que consideró necesario efectuar un estudio integral de distintos tipos de chacinados que sería llevado a cabo en forma conjunta por el Centro de Investigación y Tecnología de Carnes, del sistema de INTI y el Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología. Las conclusiones obtenidas podrían servir como base para actualizar las normas vigentes en nuestro país, para este tipo de producto, en concordancia con los avances de la tecnología moderna.

En esta primera etapa se trabajó sobre salchichas (envasadas, en lata y sueltas) de diferente origen, adquiridas en comercios de la Capital Federal y gran Buenos Aires. En algunos casos fue necesaria una intensa búsqueda para poder completar un número significativo de muestras sin repetir las marcas, de manera que podemos decir que los productos analizados son prácticamente todos los que circulan en el comercio. Los resultados obtenidos permiten por lo tanto, tener un panorama bastante completo de las características físico-químicas y microbiológicas de las salchichas que consume nuestra población.

El trabajo realizado en CITECA comprende el estudio de los siguientes temas:

- Tema 1: Características físico-químicas generales de chacinados
- Tema 2: Investigación de materia colorante agregada.
- Tema 3: Investigación de sustancias conservadoras y secuestrantes: ácido benzoico, ácido sórbico, sulfitos, ácidos cítrico y tartárico.
- Tema 4: Investigación de conservadores de color: ácido ascórbico y nicotínico. Su probable estimación.
- Tema 5: Efectuar cultivos primarios para posterior identificación en el Instituto de las cepas desarrolladas.

Los métodos usados para los análisis requirieron un trabajo previo que fue realizado con el siguiente criterio:

- 1) Revisión bibliográfica de las técnicas generales aplicadas a los productos cárneos.
- 2) Selección de los métodos más sencillos, específicos y fácilmente reproducibles.
- 3) Ensayo de los mismos trabajando directamente sobre el producto.
- 4) Previa discusión de los resultados obtenidos, elección de la técnica más conveniente para cada determinación.
- 5) Puesta a punto de la técnica elegida.

El resumen de las técnicas generales aplicadas a los productos cárneos que fueron ensayadas, la discusión de las mismas y los fundamentos para la elección de la más adecuada para cada determinación, figuran en el plan de trabajo que se presentó para su aprobación al Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología con fecha 30 9-71.

En el presente trabajo detallaremos las técnicas que se usaron. En algunos casos fueron directamente las citadas en la Bibliografía, en otros hemos combinado 2 ó más, en ocasiones fue necesario efectuar modificaciones sustanciales de las mismas y a veces crear prácticamente técnicas nuevas.

En la realización de los análisis, hemos encontrado que algunas determinaciones fueron realizadas sin problemas, y los resultados obtenidos no ofrecen ninguna duda sobre la efectividad del método. En otras consideramos que los mismos son perfectibles.

En cada caso se deja constancia de los problemas que se presentaron, destacando las técnicas que pueden aceptarse en forma definitiva, y las que deben ser modificadas. En todos los casos las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Tema 1

Características físico químicas generales de los chacinados.

Se realizaron las siguientes determinaciones: Estado de conservación (reacción de Eber), Humedad, Cenizas totales, Cloruro de Sodio, Materia Grasa, Acidez, Proteínas, Almidón, Creatinina.

A) PREPARACION DE LA MUESTRA

Se toma una cantidad de salchichas lo suficientemente representativa (250-500g) se pelan si tuvieran cobertura, y se pasan por la máquina de picar carne. Se divide finamente con la licuadora hasta formar pasta homogénea. Se guarda en frascos con tapa esmerilada, conservándose en heladera mientras no se utilicen. Es conveniente hacer las pesadas para todas las determinaciones con la muestra recientemente preparada.

B) DETERMINACION DE HUMEDAD -- Método de las Normas Francesas para productos cárneos

1) Principio

Se forma una mezcla homogénea de la muestra con arena y etanol. Se hace un presecado a Baño María y luego se deseca en estufa hasta peso constante.

2) Reactivos

a) Arena de granulometría conocida preparada según Farmacopea, 2)

Se utiliza la fracción que pasa através de un tamiz de 1,4mm de altura de malla y que es retenido por un tamiz de 0,25mm. Se trata con HCl concentrado, calentando a ebullición durante 6-8 horas. Se filtra por crisol Buchner. Se lava con agua destilada hasta total eliminación de cloruros y se calcina hasta constancia de peso.

b) Alcohol etílico

30 1 966

3) Material

- a) Recipientes de aluminio con tapa a rosca y de aproximadamente 8 cm de diámetro y 3,5cm de alto.
- b) Varillas de vidrio de aproximadamente 6-7cm de largo.

4) Técnica operatoria

Se deseca en estufa a 100°C-105°C durante 30 minutos el recipiente de aluminio conteniendo una cantidad de arena aproximadamente 3 ó 4 veces el peso de la muestra que se va a usar y la varilla de vidrio. Se enfría y pesa con la muestra. Se coloca a baño maría regulado a una temperatura entre 60°C y 80°C, de manera de evitar proyecciones, manteniendo el calentamiento hasta que el etanol se evapore.

Retirar la caja de aluminio y colocarla en estufa regulada a 100°C-105°C hasta peso constante el cual se consigue aproximadamente a las 4 horas. La humedad por ciento en peso se calcula con la fórmula:

$$\text{Agua gr/\%} = M1 - M2 \frac{x 100}{M1 - M0}$$

donde:

M0 = peso en gramos de caja + varilla + arena.

M1 = peso en gramos de caja + varilla + arena + muestra antes del secado.

M2 = peso en gramos de caja + varilla + arena + muestra después del secado.

Expresar los resultados con un solo decimal.

Conclusión

Se acepta la técnica como definitiva.

c) DETERMINACION DE CENIZAS TOTALES - Método Oficial del AOAC. 3)

1) Principio

Se obtiene el residuo de la calcinación a 500-550°C del producto preparado.

2) Material

- a) Mufla eléctrica con pirómetro
- b) Crisoles de porcelana

3) Técnica operatoria

En crisoles de porcelana previamente calcinados y tarados pesar aproximadamente 5g de muestra; quemar la muestra lentamente con un mechero, colocando los crisoles sobre una tela de amianto. Cuando la muestra está seca se llevan los crisoles a la mufla y se calcina a 500°C hasta obtener cenizas perfectamente blancas sin rastros de carbón. Dejar enfriar en desecador y pesar. Generalmente es necesario retirar 2 ó 3 veces el crisol de la mufla, dejar enfriar, tratar con muy poca agua destilada, secar en tela con muy poca llama o en baño maría para evitar proyecciones y calcinar nuevamente.

4) Conclusión

Trabajando en las condiciones descriptas no hubo problemas. Se acepta la técnica como definitiva.

D) DETERMINACION DE CLORUROS - Método de las Normas Francésas modificado. 1)

1) Principio

Sobre las cenizas obtenidas, se dosan los cloruros por el método de Charpentier Vohlard.

2) Reactivos

- a) Solución valorada de Nitrato de plata N/10.
- b) Solución concentrada de ácido nítrico.
- c) Solución acuosa de alumbre de hierro y de amonio al 4%.
- d) Solución valorada de tiocianato de potasio o de amonio N/10.

3) Material

Bureta graduada al 1/10 de ml, erlenmeyers, vasos, pipetas.

4) Técnica operatoria

Se toman las cenizas provenientes de 5gr de muestra, con 5ml de NO_3H . Se diluye con agua caliente y se pasa a un matraz aforado de 100ml. Se toman 25ml de la solución, se agregan 15ml de NO_3Ag 0,1N, 2 ml de alumbre férrico y se calienta para aglomerar el precipitado. Se titula con solución Tiocianato de potasio 0,1 N hasta viraje del indicador (color té claro). El tenor de cloruros expresados en ClNa contenido en la muestra en gr% está dado por la fórmula:

$$\text{NaCl \%} = \frac{(15 - n) \cdot 5,85}{p}$$

Siendo:

n= ml de solución de SCNK 0,1 gastados

p= peso en gramos de la muestra.

5) Conclusión

Trabajando directamente sobre las cenizas, se determinan cloruros totales. Se elimina la posibilidad de una extracción incompleta que presenta el método original y se simplifica la técnica. Los resultados son satisfactorios. Se acepta la técnica como definitiva. En caso de que la muestra no contenga fosfatos se puede aplicar el método de Mohr, o sea titular directamente los cloruros con nitrato de plata en presencia de cromato de potasio como indicador.

E) DETERMINACION DE MATERIA GRASA - Método Oficial del AOAC. 3)

1) Principio

Sobre el producto desecado (residuo de la determinación de humedad) se hace una extracción continua por medio de solventes. Se elimina el solvente por evaporación y se pesa el residuo.

2) Reactivos

Eter etílico o éter de petróleo.

3) Material

- a) Equipo Soxhlet completo.
- b) Cartuchos
- c) Cristalizadores tarados.

- d) Estufa graduada a 100--105°C.
- e) Desecador
- f) Baño maría

4) Técnica operatoria

El residuo seco obtenido de la determinación de humedad se transfiere cuantitativamente a un cartucho Soxhlet, ayudándose con trozos de algodón. Colocar el cartucho en el extractor y extraer durante 8 horas. Evaporar el extracto a baño maría, secar en estufa a 100--105°C en un cristizador tarado, hasta peso constante, enfriar en desecador y pesar.

5) Conclusión

Se acepta la técnica como definitiva.

F) DETERMINACION DE ACIDEZ

1) Principio

Por titulación con solución valorada de NaOH.

2) Reactivos

- a) Alcohol 70% neutralizado.
- b) Solución N/10 de NaOH
- c) Papel Universal de pH.

3) Técnica operatoria

Pesar 10g de muestra en erlenmeyer de 250ml, agregar 100ml de alcohol mezclando bien con varilla. Titular con solución de NaOH N/10 hasta pH 7-8 usando como indicador papel universal Merk en placa de toque.

4) Conclusión

El punto final es bastante poco preciso. Si bien determinaciones efectuadas por duplicado y triplicado no ofrecen diferencias significativas (variaciones entre 0,1 y 0,2%) consideramos que sería más conveniente efectuar una determinación de pH por potenciometría.

G) DETERMINACION DE PROTEINAS -- (Técnica Kjeldahl) -- Método Oficial del AOAC modificado. 5)

1) Principio

La muestra es mineralizada con H₂SO₄. El amoníaco obtenido es desplazado por tratamiento con NaOH concentrado, y es recibido en una solución valorada y medida de ácido.

2) Material

Equipo Kjeldahl completo.

3) Reactivos

- a) Acido sulfúrico 0,5N
- b) Hidróxido de sodio 0,5N
- c) Acido sulfúrico concentrado, densidad 1.84 libre de nitratos y sulfato de amonio.
- d) Mezcla catalizadora: 1000g de Sulfato de potasio
16g de Selenio metálico
16g de Sulfato de cobre

- e) Solución de hidróxido de sodio al 50%
- f) Granallas de zinc.
- g) Indicador Rojo de metilo

4) Técnica operatoria

a) Digestión de la muestra.

Se colocan 2g de la muestra, pesados exactamente, en un balón de Kjeldahl de 800ml de capacidad, se agregan unos 10g de mezcla catalizadora y 15ml de ácido sulfúrico concentrado, agitar suavemente y efectuar la digestión. Cuando la solución se vuelve incolora (1 hora aproximadamente) dejar enfriar, diluir cuidadosamente con aproximadamente 400 ml de agua destilada, agregar un pequeño puñado de perlas de vidrio y 2-3 granallas de zinc.

b) Destilación

Colocar en un erlenmeyer de 500ml, 20 ml de ácido sulfúrico 0,5N medidos exactamente y tres gotas de indicador Rojo de metilo, ubicar el erlenmeyer de manera que el vástago del refrigerante pesque en el ácido; para facilitar esto se pueden agregar algunos mililitros de agua destilada. Se agregan al balón entre 50 y 60 ml de la solución de hidróxido de sodio al 50% agitando suavemente, se destila y se recogen unos 300ml del destilado.

c) Valoración y Cálculo

Se titula el exceso de ácido con la solución de hidróxido de sodio 0,5N, luego se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Vol. ácido } xN - \text{Vol. hidróxido } x N) 0,014 \times 100}{\text{Peso de la muestra}} = \% \text{ Nitrógeno}$$

$$\% \text{ Nitrógeno } \times 6,25 = \% \text{ Proteínas}$$

5) Conclusión

El dato de proteínas es sólo aproximado ya que el coeficiente 6,25 es muy discutido y está calculado para proteínas de productos cárneos. Habrá que investigar los otros tipos de proteínas que pudieran estar contenidas en el producto, (de harina de soja, de leche en polvo, etc.) lo que exigiría un estudio especial.

Por otra parte el Nitrógeno determinado por mineralización, no es solamente el proteico si no el total de todos los productos nitrogenados.

Para llegar a un grado de exactitud mayor sería conveniente:

- 1) hacer una determinación de Nitrógeno no proteico (nitrógeno básico volátil aminoácidos) y restarlo del Nitrógeno total para poder tener el valor de Nitrógeno correspondiente a las proteínas.
- 2) tratar de determinar la naturaleza de las mismas para poder aplicar el factor correcto (5,27 o 6,38) . Podría intentarse una separación de proteínas por electroforesis.

H) DETERMINACION DE ALMIDON

El análisis se encara considerando que la muestra puede contener azúcares reductores, sacarosa, almidón.

Sería necesario para tener resultados exactos separar los azúcares por cromatografía, identificarlos, evaluarlos cuantitativamente y determinar por separado el almidón.

Esto requiere una técnica complicada que no se pudo encarar en esta primera etapa.

Se hicieron ensayos cualitativos que nos permitieron concluir que en su gran mayoría las salchichas tienen ninguna o muy poca proporción de azúcares reductores y elevado contenido de almidón, por lo cual nos hemos limitado a efectuar una determinación de hidratos de carbono totales, expresando los resultados como almidón.

1) Principio de la Técnica seguida

Se efectúa una hidrólisis ácida del producto seco y desgrasado y se titulan los monosacáridos resultantes con el reactivo de Fehling-Causse-Bonnas.

2) Reactivos

- a) Acido clorhídrico concentrado.
- b) Solución de NaOH al 30%.
- c) Solución de ferrocianuro de potasio al 15%
- d) Solución de acetato de Zinc al 30%
- e) Reactivo de Fehling-Causse-Bonnas. 6)
- f) Solución de glucosa al 5 ‰
- g) Solución de azul de metileno al 1%
- h) Solución de Lugol (mezcla de 1 solución de iodo al 0,5% y ioduro de potasio al 1% en agua).
- i) Alcohol octílico.

3) Técnica operatoria

El material remanente de la extracción de grasa, contenido en el cartucho de Soxhlet, se pasa a un erlenmeyer de 125ml, se agregan 60ml de agua destilada y 6ml de ClH concentrado. Se calienta a reflujo en baño maría regulado a 100°C durante 3 horas.

Se enfría. Se neutraliza con NaOH (sol. b) hasta pH7, verificado al toque con papel pH. Se trasvasa cuantitativamente a matraz aforado de 100ml. Se agregan 2ml de ferrocianuro de potasio y 2ml de acetato de zinc (c y d), agitando después de cada agregado. Para asegurar la total precipitación de las proteínas se agregan 2 ó 3 gotas más de cada uno de los reactivos y se observa si hay formación de precipitado.

Cuando se completa la precipitación de las proteínas se lleva a volumen con agua destilada (en caso de formación de espuma, se destruye ésta con algunas gotas de alcohol octílico).

Se filtra por papel plegado Whatman N° 1. Sobre el filtrado se determinan azúcares reductores con el reactivo de Fehling-Causse-Bonnas, valorado con una solución de glucosa al 5‰, en condiciones standard de calentamiento y velocidad de goteo.

Se hace una primera titulación del filtrado proveniente de la hidrólisis para establecer si la concentración de azúcares es aproximada a la del testigo de glucosa 5‰ y se puede usar tal cual; o si es más concentrada y por lo tanto se debe efectuar una previa dilución. Hecha la solución de concentración

conveniente, se titulan por duplicado los azúcares.

La titulación se efectúa de la siguiente manera:

En un erlenmeyer de 250ml se colocan 15ml del reactivo F.C.B y 50 ml de agua destilada, se calienta y cuando la solución comienza a hervir se añade por medio de la bureta la solución problema (o en caso de calcular el factor la solución de glucosa) a razón de aproximadamente 1-2 gotas por segundo, cuidando de no interrumpir la ebullición.

Cuando el reactivo toma una coloración verdosa se añaden tres gotas de solución al 1% de azul de metileno y se continúa valorando hasta que el líquido sea perfectamente límpido y de color amarillento.

Cálculo:

Se calcula previamente el factor de la solución F.C.B..

F = Cantidad en gramos de glucosa que reducen a 15ml del reactivo FCB

Se calcula el almidón mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Almidón} = \frac{F \times 250 \times 100}{m \times p} \times 0,9$$

F = factor del FCB

m = mililitros gastados en la titulación

p = peso de la muestra

0,9 = factor para el almidón

4) Conclusión

Este método que fue elaborado en base a las características del producto analizado, si bien es bastante largo es menos complicado que todos los descriptos en la bibliografía ya que se trabaja directamente sobre el producto seco y desengrasado. Se hicieron ensayos de recuperación que fueron satisfactorios para tenores de almidón superior 2%. Para porcentajes menores los valores son muy aproximados y no hay reproducibilidad de resultados.

En los casos en que las concentraciones máximas que se pueden obtener se alejan de las requeridas por el método de FCB debe aplicarse un método de mayor sensibilidad. Se sugiere para esos casos la posibilidad del uso del método colorimétrico de Glover . 7)

I) DETERMINACION DE CREATININA

La base creatina y su anhídrido creatinina se presentan en los músculos en las vísceras y en los extractos de carne. Por calentamiento o tratando en autoclave la creatina es convertida en creatinina.

1) Principio

La creatinina es extraída de la muestra aprovechando su solubilidad en agua. Previa formación del clorhidrato se efectúa una cromatografía en papel.

2) Reactivos

- a) Acido tricloroacético
- b) Acido clorhídrico concentrado
- c) Alcohol etílico
- d) N--propanol

- e) Solución acuosa de amoníaco al 3%
- f) Solución patrón de creatinina al 0,1%
- g) Solución de ácido pícrico al 1% en etanol
- h) Solución alcohólica de hidróxido de potasio en etanol al 80%
- i) Líquido de corrimiento: n-propanol-solución acuosa de NH₃ al 3% (4:1)

3) Técnica operatoria

a) Separación de la creatinina.

Se pesan 5g de la muestra. Se agrega 25ml de agua destilada. Se desproteíniza con aproximadamente 2.5-3g de ácido tricloroacético. Se calienta durante 20 minutos, separándose las grasas y coagulando las proteínas; se deja enfriar en heladera y se filtra. En la solución acuosa se investiga creatinina.

Se toman 2ml de la solución acuosa y se agregan 4ml de HCl concentrado para formar el clorhidrato de creatinina. Se lleva a sequedad en cápsula de porcelana.

Se disuelve el residuo en 2-3ml de alcohol etílico y se pasa el extracto alcohólico por una columna de óxido de aluminio para adsorción cromatográfica según Brockman; con esto se eliminan las sustancias interferentes. El extracto alcohólico se lleva a sequedad y se retoma el residuo con 0,5ml de agua destilada.

b) Cromatografía ascendente

Se siembra en papel Whatman N° 1 aproximadamente 30ml del extracto acuoso.

Se deja correr aproximadamente 20 cm, en la solución de corrimiento i) lo que insume 20 horas. Se seca y revela. Se trabaja con patrones de creatinina (solución al 0,1% sometida a las mismas condiciones que la muestra para formar el clorhidrato).

c) Revelado: (Reacción colorimétrica de Jaffe.)⁸⁾

Se pulveriza el papel con la solución de ácido pícrico, se deja secar; luego se pulveriza con la solución alcohólica de KOH (h).

La creatinina aparece como una mancha anaranjada sobre fondo amarillo.

4) Conclusión

Esta técnica cualitativa de cromatografía en papel se aplicó en todas las muestras obteniéndose resultados satisfactorios. Se adoptó la misma por su mayor sencillez y simplemente como ensayo cualitativo de la presencia de carne en el producto.

Tema 2

J) INVESTIGACION DE MATERIA COLORANTE AGREGADA

Hay que proceder a la extracción y separación del colorante y a su posterior identificación. Dada la composición química de los chacinados (50% de agua y 15% de grasa, como valores medios), pueden ser incorporados, tanto colorantes hidrosolubles, como liposolubles. Por lo tanto debe hacerse primero un ensayo previo para determinar el tipo del colorante, y aplicar luego la técnica apropiada para su identificación.

1) Extracción y separación del colorante. 9)

A) Colorantes hidrosolubles.

Extracción con agua y separación por fijación en lana.

Se toman 50g de la muestra preparada, se agregan aproximadamente 250cm³ de agua destilada y se hierve suavemente durante 1 hora. Se filtra en caliente, agrega 2ml de ácido acético glacial y unas hebras (\pm 4g) de lana desengrasada. Se hierve suavemente y observa si colorea la lana. En caso afirmativo, se retira la lana, se lava y se cede el colorante a una solución de hidróxido de amonio al 1% (100ml). Se vuelve a acidificar y se fija una nueva lana.

En las muestras que fueron analizadas se anotaron las siguientes observaciones:

--En algunos casos el agua no se colorea.

--El agua colorea con poca intensidad. En algunas de las muestras que presentan esta característica no hay fijación del color en la lana. En los casos en que hay fijación el color se destruye al efectuar el desmonte en medio alcalino o en el primer pasaje.

Por lo tanto en todos los casos hay que descartar la presencia de colorantes derivados del alquitrán de hulla hidrosolubles. Para investigar colorantes vegetales hidrosolubles se efectúan los siguientes ensayos sucesivos. 10)

- a) Se macera 20-200g de producto con 4-5 veces su peso de alcohol 80%.
- b) Idem con alcohol 70% conteniendo 1% de hidróxido de amonio.
- c) Idem con alcohol y HCl (2%)
- d) Idem con agua y HCl (2%)
- e) Idem con alcohol a 96°
- f) Idem con acetona

Cuando se trata de mezclas de colorantes, los naturales más los agregados, a veces es necesario hacer extracciones sucesivas con más de un medio hasta que el producto quede decolorado.

Si los extractos tienen alcohol, se calientan hasta evaporarlo en su mayor parte. Una vez que se tiene el colorante concentrado, se siembra en tiras de papel Whatman N°1 hasta obtener una mancha de bastante intensidad, usando aire caliente para restringir el tamaño de la mancha. La siembra puede hacerse en placas de Silicagel.

Se hace correr en los siguientes medios:

- 1) Medio salino: solución acuosa de ClNa al 1,25%
- 2) Medio ácido : alcohol 96% - ácido acético - agua destilada (80-5-15)
- 3) Medio alcalino: alcohol butílico saturado de amoníaco.

En todas las muestras investigadas hubo una buena extracción de color en medio alcohólico a 96° y en sus diluciones, ya sea en medio neutro, ácido o alcalino, así como en acetona. Pero en ningún caso se pudo aislar el colorante, para efectuar la cromatografía, ya que al calentar para evaporar el solvente, la coloración va variando de color rojo intenso a marrón, verdoso, pardo, hasta que se destruye. Es decir que también hemos descartado la posibilidad de colorantes vegetales hidrosolubles agregados, ya que todos ellos son más estables, que el que

hemos encontrado en los chacinados.

Consideramos que el color que se extrae en los medios que hemos citado anteriormente es debido al pigmento normal de la carne: la mio-globina. 11) La mio-globina es un compuesto muy complejo constituido por una cadena de núcleos pirrólicos (la porfirina) unida a un átomo de Fe bivalente. El color de este complejo depende del grado de oxidación del hierro y del estado físico de la globina. Durante el procesado de las salchichas, la mio-globina reacciona con el O_2 y el óxido nitroso dando lugar a la formación de la oximioglobina y nitrosomioglobina, de color rojo brillante, que son compuestos de oxigenación, ya que el hierro sigue como bivalente. Con una oxidación más profunda, el Fe^{++} del pigmento hemo, es oxidado a Fe^{+++} dando la metamioglobina de color marrón.

Por otra parte, la porción proteica, por acción del calor, se degrada, produciendo pigmentos de color pardo. Estos procesos de oxidación y degradación explican el cambio de color de la solución hidroalcohólica de color rojo brillante cuando se calienta.

Descartada la presencia de pigmentos hidrosolubles agregados se procedió a la búsqueda de colorantes liposolubles, para lo cual se ensayaron los clásicos solventes de grasas (éter de petróleo, benzol, éter etílico, alcohol-éter) comprobándose que en casi todos los casos hay extracción de color.

Los colorantes que se extraen en solventes de grasas pueden ser:

Naturales: Productos de degradación de la mioglobina y sus derivados, compuestos de oxidación de la materia grasa.

Agregados:

Colorantes vegetales

{ Rocú
{ Caroteno y derivados

Colorantes derivados
del alquitrán de hulla

{ Sudanes (derivados del
{ benceno-azo-naftol)

Para descartar la presencia de azocolorantes hemos usado el método de Doolittle (12) que consiste en tratar el extracto etéreo con igual volumen de ácido clorhídrico y ácido acético diluido. Una capa acuosa rojiza indica colorante azoico.

En todos los casos la reacción resultó negativa.

Para tener un ensayo de orientación acerca de la naturaleza del colorante liposoluble extraído, hemos elegido como solvente el éter etílico para aprovechar la extracción de grasa según el método Soxhlet que nos asegura una separación integral del colorante liposoluble efectuada siempre en las mismas condiciones. Se evaporó una porción de los extractos sobre placa de toque, y sobre el residuo se efectuaron ensayos con distintos reactivos, HCl , Cl_3Fe , Cl_3Sb , NH_4OH , HCl etc. realizadas en paralelo con extractos etéreos de colorantes testigos. Dado que la gran cantidad de grasa presente en las salchichas enmascara el color de las reacciones, se agregaron los colorantes a muestras de salchichas y se hizo una extracción en Soxhlet, como en todos los otros casos.

TABLA DE LAS REACCIONES EFECTUADAS

Reactivos

Muestra Nº	H ₂ SO ₄ conc.	HCl conc.	Cl ₃ Fe(sol. etérea sat.)	Cl ₃ Sb (sol. cloro- fórmica sat)	H ₂ O ₂ al 30%	NH ₃ concent.
1	Pardo	Decolora	Amarillo	Rosado Parduzco	Decolora	Decolora
2	Pardo	Decolora	Pardo	Pardo	Decolora	Decolora
3	Verdoso	No Altera	Verdoso	Verde	No Altera	No Altera
4	Pardo	Decolora	Pardo	Pardo	Decolora	Decolora
5	Pardo	Decolora	Pardo	Pardo	Decolora	Decolora
6	Pardo	Decolora	Amarillo	Pardo	Decolora	Decolora
7	Pardo	Decolora	Pardo	Pardo	Decolora parcialmente	No Altera
8	Pardo Verdoso	No Altera	Verdoso	Azulado	No Altera	No Altera
9	Pardo Verdoso	Anaranjado	Verdoso	Azulado	No Altera	No Altera
10	Pardo	Decolora	Amarillo	Pardo	Decolora	Decolora
11	Pardo	Amarillo	Pardo	Pardo	Decolora parcialmente	No Altera
12	Pardo	Decolora	Amarillo	Amarillo	No Altera	Decolora
13	Pardo	Amarillo	Pardo	Pardo	Decolora parcialmente	No Altera
14	Pardo Verdoso	Anaranjado	Verdoso	Azulado	No Altera	No Altera
15	Pardo	Decolora	Amarillo	Pardo	Decolora	Decolora
16	Pardo	Decolora	Amarillo	Rosado	Decolora	Decolora
17	Pardo	No Altera	Amarillo	Rosado	Decolora	Decolora
18	Pardo	No Altera	Amarillo	Rosado	Decolora	Decolora
19	Pardo	No Altera	Amarillo	Rosado	Decolora	Decolora
20	Pardo	Decolora	Amarillo	Pardo	Decolora parcialmente	Decolora
21	Pardo	Decolora	Amarillo	Pardo	Decolora	No Altera

Muestra N°	H ₂ SO ₄ conc.	HCl conc.	Cl ₃ Fe(so. etèrea sat.)	Cl ₃ Sb (so. cloro-fòrmica sat)	H ₂ O ₂ al 30%	NH ₃ conc.
22	Pardo	No Altera	Amarillo	Pardo	No Altera	No Altera
23	Pardo	No Altera	Amarillo	Pardo	Decolora	Decolora
24	Pardo	Decolora	Amarillo	No Altera	Decolora	No Altera
25	Pardo Verdoso	No Altera	Verdoso	Rosado	No Altera	No Altera
26	Pardo	Decolora	Amarillo	No Altera	Decolora	No Altera
(*) A	Azul	No Altera	Verde	Azul	No Altera	No Altera
(*) B	Pardo Verdoso	No Altera	Verdoso	Azulado	No Altera	No Altera
(*) C	Pardo azulado	Poco cambio	Verdoso	Verde	Amarillo	Amarillo
(*) D	Azul Verdoso	No Altera	Amarillo	Violáceo	No Altera	No Altera
(*) E	Azul Verdoso	No Altera	Amarillo	Violáceo	No Altera	No Altera

(*) Extracto etéreo de las salchichas con agregado de colorantes testigos

- A) β caroteno suministrado por la firma Roche Productos S.A.Q. e I.
- B) Cantaxantina (suministrada por la misma firma).
- C) Colorante amarillo Q. liposoluble suministrado por la firma Saporiti Hros. que hemos identificado como "Rocú".
- D) Producto Red Tone (humectante y saborizante de salchichas) suministrado por Laboratorios Argentinos Parmesa SRL cuyo colorante hemos identificado como una mezcla de capsantina y caroteno (colorante rojo de pimentón).
- E) Extracto etéreo de pimentón.

Conclusión:

De la aplicación de la técnica en "placa de toque" se concluye que las muestras Nos. 14, 3, 8, 9 y 25 tienen agregado un colorante natural liposoluble que podría ser del tipo de la bixina (rocú) o de los carotenoides.

La determinación exacta de la naturaleza del mismo requiere técnicas más depuradas. Se ensayó una técnica por cromatografía en capa delgada ideada por Lehman y Col (1970) 13) y 14) para colorantes liposolubles naturales (carotenos, licopenos, etc.) que dio resultados muy satisfactorios para separar colorantes testigos. Aplicada a las muestras en estudio hubo algunas dificultades, por la gran cantidad de grasa presente. Como no se ensayó un número suficientemente grande de muestras y no se completaron los ensayos de recuperación e identificación, queda como método tentativo. Intensificando su estudio podrían obviarse los inconvenientes observados en la detección de colorantes liposolubles agregados.

En aquellas muestras de salchichas donde los ensayos de materia colorante agregada fueron negativos, todo el color rosado se debería a la reacción entre la mioglobina presente en las muestras y los agentes de cura (NO_2^- y NO_3^-); conclusión que también está avalada por la presencia de ácido níctico (preservativo del color rojo de las carnes) en casi todas las muestras analizadas.

Se pensó, entonces, en una determinación de los pigmentos naturales (15) aplicándose en algunas muestras la técnica de Harnsey (16) basada en la extracción con acetona-agua del pigmento nitroso-hemocromo (color rosado). La solución acetónica fue barrida a $650\text{m}\mu$ - $420\text{m}\mu$, en un espectrofotómetro modelo CARY14 (USA). La curva del análisis presentó los tres máximas características a: 476, 535 y $563\text{m}\mu$. Se presentaron algunas dificultades quedando el ensayo como tentativo ya que habría que estudiar un número suficientemente grande de muestras e intensificar todos los ensayos correspondientes.

Tema 3

K) INVESTIGACION DE SUSTANCIAS CONSERVADORAS Y SECUESTRANTES.

Sustancias conservadoras:

Se investigaron: Ácidos benzoico, sórbico, salicílico, p-hidroxibenzoico y sus ésteres. Es necesario separar primero los conservadores y luego proceder a su identificación.

Método obtenido por combinación y modificación de varias técnicas.

Se utilizó el procedimiento ideado por J. Rajama y P. Mäkelä (17) para conservas de frutos y alimentos de contenido medio en grasa. Se modificó esta técnica para su aplicación a productos cárneos con un contenido en grasa del 15 al 25%. El procedimiento es simple y rápido y no requiere ningún aparato complicado.

1) Principio

Se efectúa una extracción y cromatografía simultánea en papel. Luego el papel se somete a dos cromatografías, ascendentes. Una para ácidos y otra para ésteres, visualizándose los mismos a la luz UV.

2) Reactivos:

- a) Solvente de extracción: éter etílico
- b) Solución de impregnación: 1 parte de sol. de NaOH 0,5N en agua y 2 partes de acetona; la acetona se añade inmediatamente antes de usar el reactivo.
- c) Agente arrestante alcalino: solución saturada de bicarbonato de sodio.
- d) Solvente de corrimiento: alcohol isoamílico, etanol y NH_4OH al 10%. (6:3:2).

3) Material

- a) Recipiente de extracción: Se utiliza para este propósito un desecador de aproximadamente 15 cm de diámetro interno del tipo de los que poseen un estrangulamiento en la parte inferior y dos placas de vidrio que cierran el mismo, mediante bandas elásticas, dejando una ranura donde se coloca la tira de papel. El borde del desecador debe ser uniforme para que haga cierre hermético y mantenga una atmósfera saturada de éter. De otra manera éste se evaporaría del papel antes de alcanzar la ranura entre las placas de vidrio.

- b) Papel cromatográfico Whatman 3MN: cortado en tiras de 5cm de ancho y de una longitud entre 15-30 cm de acuerdo a las necesidades del análisis.
- c) Cuba para cromatografía ascendente.
- d) Lámpara luz UV 254 $\mu\mu$.

4) Técnica operatoria

- a) Extracción de los conservadores: 150-200g del producto perfectamente homogeneizado se emulsionan con el doble de su peso de alcohol etílico en una licuadora. Se siembran aproximadamente 0,5g de esta emulsión a 2,5cm del borde de la tira de papel Whatman 3MN (de 5 x 30cm) en la que previamente se depositó a 2-3 cm de la línea de siembra, el agente arrestante "alcalino" c). Se debe verificar el pH de la muestra. En caso de no ser lo suficientemente ácido, se lleva a pH adecuado (4-5) con HCl diluido.

Una vez hecha la siembra, se deja el papel 3-7 minutos en equilibrio con el aire, de manera que la humedad se distribuya en forma pareja a lo largo de la línea de siembra, sin embargo, no debe permitirse que el material se seque.

Se coloca la tira en el recipiente de extracción a través de la ranura entre las placas de vidrio de manera que pesque en el fondo del desecador que contiene el solvente de extracción.

El éter se absorbe en el papel y se evapora en la ranura, concentrando la grasa y los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico como una línea angosta en el frente del solvente mientras los ácidos quedan retenidos en la línea de bicarbonato. La extracción se completa en 15-30 minutos (ver fig. 1).

- b) Separación de los conservadores: Se corta el papel 1 cm por debajo de la grasa depositada en el frente de evaporación del solvente y 1 a 2cm por debajo de la línea de bicarbonato. Se tienen dos porciones A y B; la porción A se introduce en una cuba cromatográfica conteniendo como solvente de corrimiento la solución d).

Los ácidos corren todos juntos formando una banda que se visualiza a la luz UV 254 $\mu\mu$ (ver fig. 2) y que se marca. La porción B de la tira se sumerge en la solución (b) recientemente preparada, hasta que el líquido llegue a 1-2cm de la línea donde está depositada la grasa y los ésteres. Se somete la tira a una nueva extracción con éter; los ésteres se separan unos de otros como bandas diferentes en la región alcalina y se visualizan a la luz UV a 254 $\mu\mu$. Las grasas se extraen en la línea de evaporación del solvente, quedando retenido en el borde inferior de dicha región alcalina el ácido p-hidroxibenzoico. En todos los casos se marcan las bandas que se observan.

Determinación de la sensibilidad del método

- a) Cálculo de la concentración de conservadores en la muestra original, considerando como cantidad de conservador agregado: 0,5g/kg.

A los efectos del ensayo se preparó una emulsión de aproximadamente 160g (contenido de un paquete) de salchichas de viena, picadas con máquina y pasadas por licuadora, y dos veces su peso de alcohol absoluto; se mezclan en una mezcladora automática (licuadora) obteniéndose 480g de emulsión.

Se toman porciones de 50g cada una A, B, C, D y E que contienen aproximadamente 16.6g de muestra original.

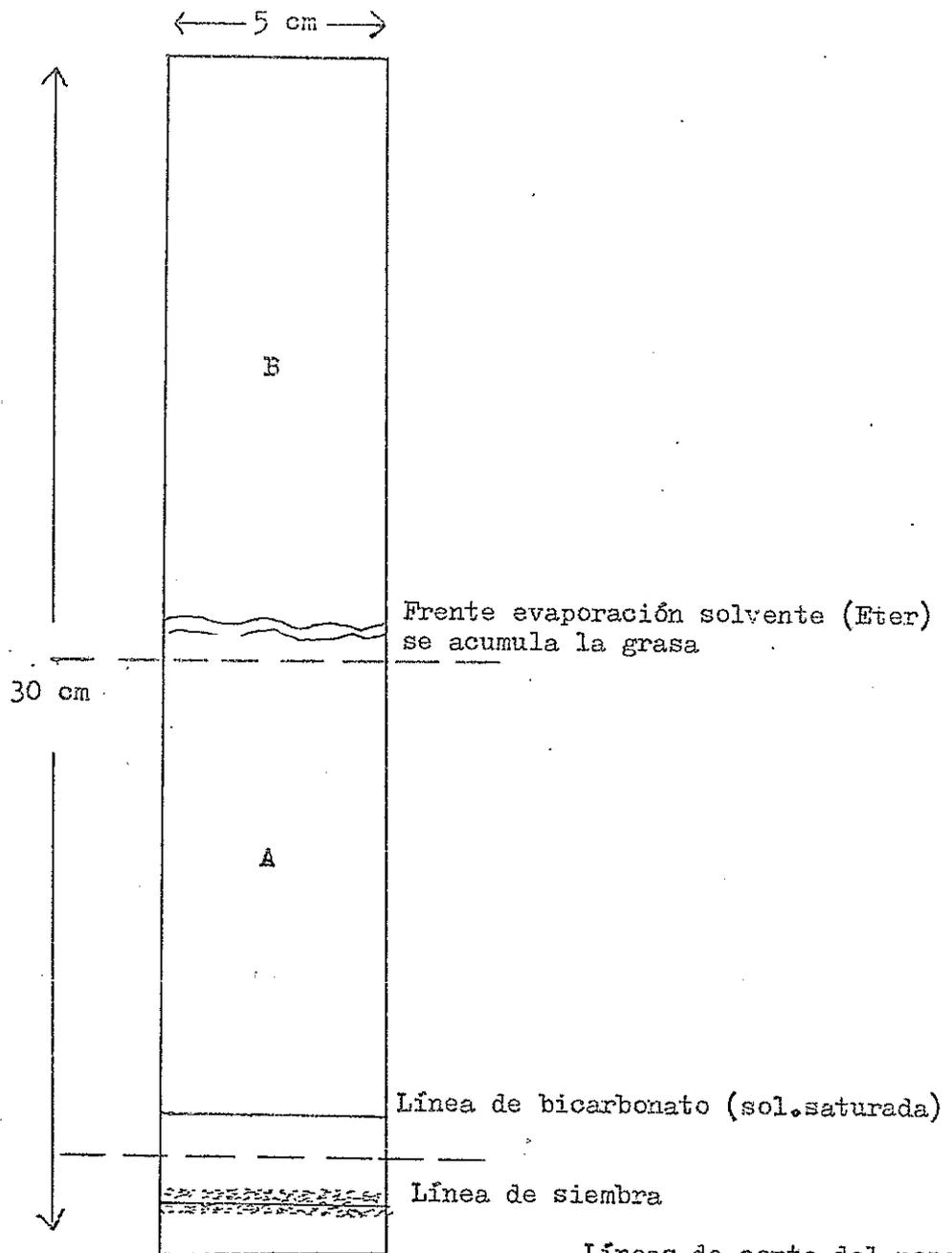


Fig. 1

 Líneas de corte del papel
 para una posterior cromatografía ascendente.

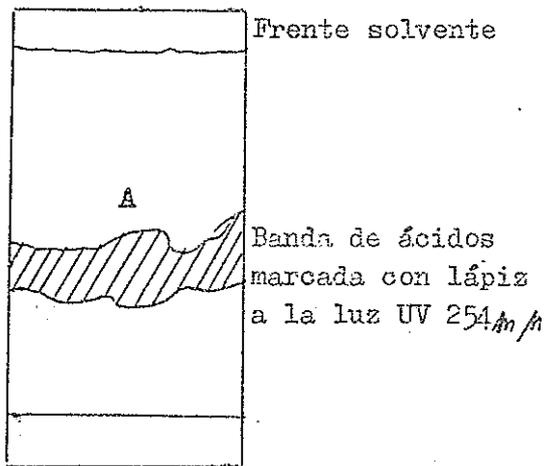


Fig. 2

Líquido de corrimiento: alcohol isoamílico
 etanol NH_4OH 1/10 (6:3:2)
 4

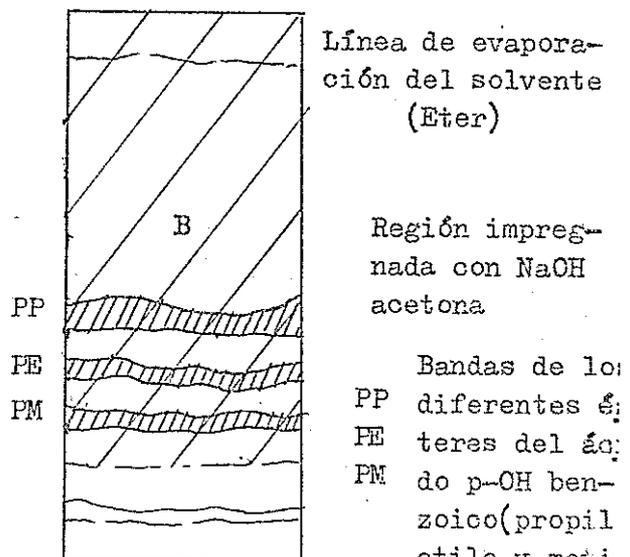


Fig. 3

Bandas de los
 PP diferentes ésteres del ácido p-OH benzoico (propil etilo y metil) marcadas a la luz UV 254mμ

b) Cálculo de la cantidad probable de conservadores en una muestra de siembra. Considerando que se agregan 0,5g de conservadores/Kg. de salchicha y estimando que en los 500mg de la emulsión sembrada hay 166mg de la muestra original se obtiene la cantidad probable de 83% de conservador.

c) Recuperaciones:

Se agregó a B, C, D y E cantidades de conservadores (soluciones al 1% en etanol) de ácido salicílico, sórbico y benzoico, p-hidroxibenzoato de metilo y de propilo, de manera de tener las siguientes concentraciones para 500mg de emulsión que es lo que se siembra :

	A	B	C	D	E
	-	5%	10%	100%	200%

Se efectuó la extracción y cromatografía simultánea para ácidos. Se observó a la luz UV 254m μ encontrándose que:

Muestras	Cantidad de Conserv.	Acidos			Esteres	
		Benzoico	Salicílico	Sórbico	p-hidroxibenzoato de metilo.	p-hidroxibenzoato de propilo
A	-	-	-	-	-	-
B	5%	-	+	+	+	+
C	10%	+	+	+	+	+
D	100%	+	+	+	+	+
E	200%	+	+	+	+	+

El límite de detección para el ácido benzoico y los ésteres es de 10% los restantes se visualizan desde 5% de concentración.

El método es altamente satisfactorio, para poder detectar la presencia de las sustancias conservadores ensayadas dentro de los límites señalados, pero no permite la identificación de ácidos o ésteres por separado.

Para ello hemos completado la técnica descrita, realizando una elución del papel en las zonas donde se concentran los conservadores. La elución se hace con alcohol para la banda de los ácidos, y con éter etílico para las que forman los ésteres.

En ambos casos hay que dejar en contacto por lo menos 30 minutos. Por concentración de los líquidos de elución en cápsulas de porcelana, hasta 1ml. se tienen dos extractos: Extracto alcohólico (I) de elución de los ácidos, Extracto etéreo (II) elución de los ésteres.

Este método fue ensayado comparándose sus resultados con los obtenidos mediante la aplicación de un procedimiento de extracción clásico, y la identificación de los conservadores recuperados, por cromatografía en capa delgada.

La extracción de los conservadores se efectúa por arrastre con vapor en medio ácido (18) y la identificación de los mismos aplicando la técnica de Gossele y Frizman Srebrnik (19).

Reactivos

a) cloruro de sodio

- b) ácido sulfúrico concentrado.
- c) éter etílico
- d) soluciones etanólicas al 1% de: ácido benzoico, ácido salicílico, ácido sórbico, p-hidroxibenzoico y sus ésteres.
- e) solvente de corrimiento: éter de petróleo-cloroformo-ácido fórmico (100:40:10).

Material

- a) Aparato de destilación por arrastre con vapor de agua
- b) Ampollas de decantación
- c) Placas para cromatografía de 20 x 20 cm utilizando como soporte una mezcla de Kieselgel G-Kieselgur G Merk (1:1). Secadas en corriente de aire caliente 10 minutos y luego activados a 110°C durante 30 minutos.
- d) Cubas de cromatografía ascendente.

Técnica operatoria

- a) Extracción de los conservadores

A 50g de una muestra preparada que no tiene conservadores se añaden 2,5ml de cada una de las soluciones patrones (d) y 30g de cloruro de sodio. Se acidifica con ácido sulfúrico y se destila por arrastre con vapor. Se recogen aproximadamente 100ml del destilado, se tratan en ampolla de decantación con aproximadamente 80ml de éter etílico, se evapora la capa etérea a 50°C y se toma el residuo con 1-2ml de alcohol etílico: Extracto III.

- b) Identificación de los conservadores:

Se siembra en una placa (c) 100 μ g de ácido benzoico patrón, 25 μ g de los restantes conservadores y una mezcla de todos ellos manteniendo las concentraciones indicadas.

En otra placa se siembran la mezcla de patrones, el extracto I, el II y el III.

Se colocan las placas en las cubas de cromatografía conteniendo el solvente de corrimiento (e). Se deja correr 14cm (3-4 horas), se secan las placas al aire y se observan bajo luz UV 254 $m\mu$ marcándose las manchas. La separación es bastante satisfactoria para los conservadores ensayados en las proporciones indicadas (ver fig. 4).

Es conveniente completar esta observación con el uso de los siguientes re-veladores químicos específicos que se pulverizan sobre la porción de la placa correspondiente a cada conservador:

Para el ácido benzoico: Se utiliza una solución de 4.5ml de agua oxigenada al 30%, 4.5ml de agua destilada y 1 ml de solución saturada de sulfato de manganeso (como catalizador). Se seca 3 minutos y se repite la operación. Da una mancha parda sobre fondo blanco, se vuelve a secar y se trata con solución al 0.3% de $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se obtiene una mancha blanca que se vuelve marrón por el secado.

Para el ácido sórbico: Se pulveriza con una solución formada por 5ml de di-cromato de potasio al 0,5% y 5ml de ácido sulfúrico 0,3N. Luego de secar se trata con solución saturada de ácido tiobarbitúrico. Al secar aparece una mancha rosada sobre fondo blanco, interfieren productos de oxidación de grasas rancias.

Para el ácido salicílico: Con solución acuosa de tricloruro férrico al 0,3%, da una mancha violeta, cuya aparición se observa luego de secar.

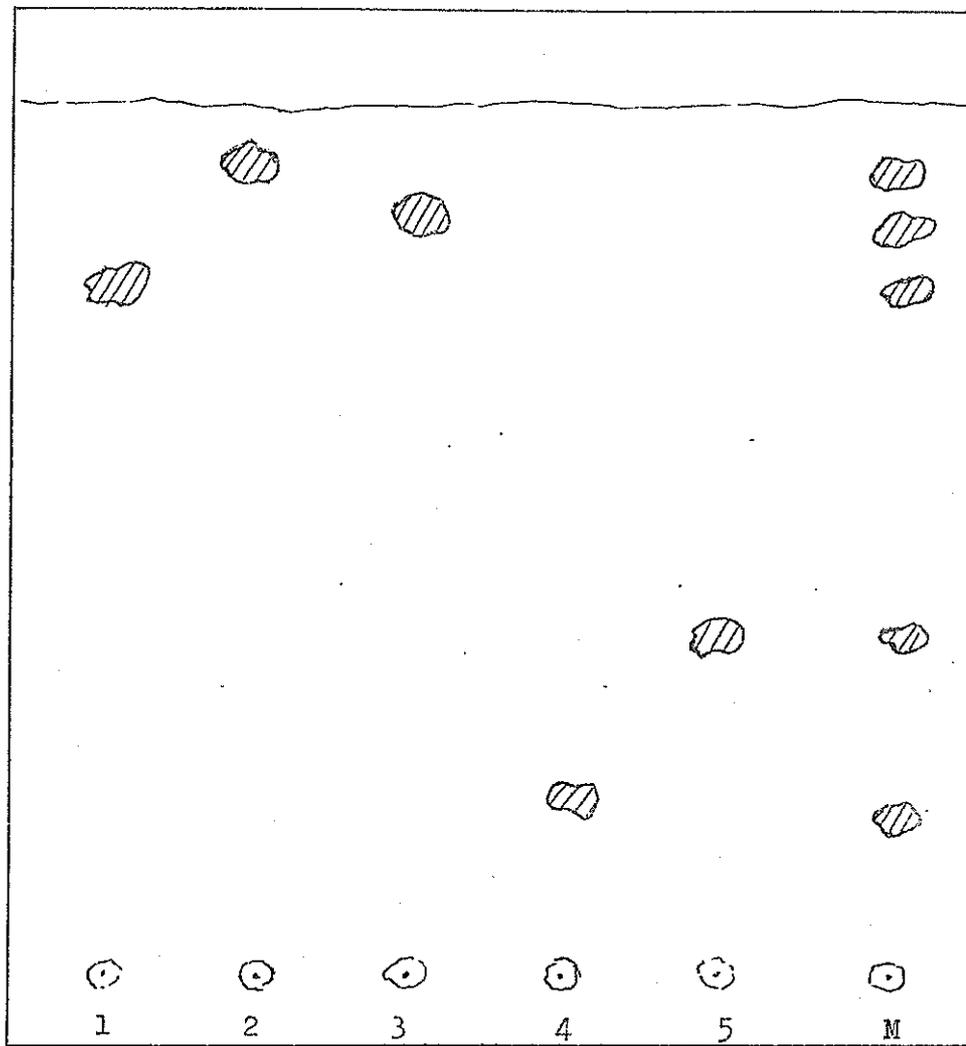


Fig. 4

	Cantidad sembrada	Rf
1 Acido salicilico	25%	0.63 - 0.74
2 Acido Sórbico	25%	0.72 - 0.80
3 Acido Benzoico	100%	0.77 - 0.86
4 p-hidroxibenzoato de metilo	25%	0.19 - 0.20
5 p-hidroxibenzoato de propilo	25%	0.29 - 0.31
M Mezcla de los cinco conservadores	100%	

Para los ácidos p-hidroxibenzoico y propil, etil y metil p-hidroxibenzoatos

El mejor reactivo es el de Millon compuesto por una parte de mercurio (en peso), dos partes de ácido nítrico fumante y dos volúmenes de agua destilada. Los ésteres dan junto con el ácido libre una mancha marrón-rojiza o roja; si después del primer pulverizado las manchas no son claras, la placa se pulveriza por segunda vez, calentando por unos minutos a 100°C.

Conclusión

Aplicando el método de extracción clásico (Extracto III) la recuperación y la identificación a la luz UV y mediante reveladores químicos fue satisfactoria.

Con el método utilizado la recuperación de ésteres fue negativa (Extracto II). Trabajando con el extracto I se observó la presencia de los ácidos a la luz UV 254 m μ . El revelado químico fue positivo para el ácido salicílico, no así para los ácidos sórbico y benzoico.

Es decir que el método estudiado (modificación del de Rajama y Mäkelä) puede ser usado con éxito para investigar la presencia de los conservadores en los productos cárneos. En los casos en que los resultados son positivos se aconseja utilizar como método de extracción el de arrastre con vapor, ya que permite trabajar con mayor cantidad de muestra y para identificar cada uno de los conservadores el método de Gossele y Srebrnik.

En las muestras analizadas no se encontró ninguno de los conservadores que fueron investigados.

Investigación de SULFITOS:

Este conservador permitido en otros países, es prohibido por nuestra legislación, por lo cual nos hemos limitado a investigar cualitativamente.

1) Principio

Destilación del anhídrido sulfuroso obtenido y detección del mismo con papel reactivo de iodato de potasio y almidón. 20) y 21)

2) Reactivos

- a) Acido fosfórico siruposo
- b) Solución de iodato de potasio al 5%
- c) Solución de almidón al 1%
- d) Tiras de papel de filtro de 3cm x 10cm.

3) Técnica operatoria

A 25-30g de muestra contenidos en un erlenmeyer, se agregan 40-45ml de agua destilada, homogenizando bien con varilla y se añaden 5ml de ácido fosfórico. Se tapa con un corcho, que sostiene una tira de papel de filtro embebida en las soluciones (b) y (c). Se calienta a baño maría. En caso positivo el papel da color azul antes de 10 minutos.

Investigación de Sustancias SECUESTRANTES (Ácidos cítrico y tartárico)

Estos ácidos actúan como agentes secuestrantes (antioxidantes sinérgicos) formando quelatos con los metales (cobre, hierro, níquel y estaño) anulando de esta manera la acción catalítica de los mismos en los procesos de autooxidación de las grasas. (22).

Investigación de ácidos Cítrico y Tartárico

1) Principio

Sobre el extracto acuoso de la muestra, desgrasado y desproteínizado, se determinan los ácidos cítrico y tartárico por colorimetría.

2) Reactivos

- a) Anhídrido acético
- b) Piridina
- c) Solución saturada de metavanadato de sodio
- d) Acido acético glacial
- e) Solución de Permanganato de potasio (1% en sol. de hidróxido de potasio)
- f) Reactivo de Imbert (solución acética de nitroprusiato de sodio).
- g) Amoníaco concentrado.

3) Técnica Operatoria

a) Separación de los ácidos:

Se utiliza la solución acuosa preparada tal como se indicó en la pag. 9 para investigación de la creatinina.

b) Reacciones colorimétricas 23).

Reacciones con anhídrido acético y piridina: Da resultados positivos tanto para el ácido cítrico como para el tartárico.

En el primer caso se desarrolla una coloración carmesí y en el segundo verde esmeralda. La sensibilidad es de 0,015 a 0,4mg.

Técnica operatoria:

1 ml de solución acuosa se trata con 8ml de anhídrido acético en tubo de ensayo; se tapa con tapón de goma y se coloca en baño de agua a 60°C durante 10 minutos.

Se añade 1 ml de piridina. Se vuelve a tapar, colocándose en el baño durante 60 minutos. Se transfiere a baño de hielo durante 5 minutos.

En todos los casos se trabaja con la muestra tal cual, en paralelo, con la misma, a la que se agrega 0.02g% de ácidos cítrico y tartárico, ya que las interferencias del medio de la muestra, enmascaran las coloraciones a obtener.

En el caso de que se desarrolle color se ensayan reacciones de identificación para cada ácido.

-Para el ácido tartárico y tartratos

Reacción del Metavanadato: Cuando se trata una solución incolora de metavanadato de sodio con ácido acético glacial se desarrolla una coloración anaranjada. En presencia de tartrato o tartárico pasa a roja. La intensidad es proporcional a la cantidad de ácido presente.

La máxima intensidad de color se obtiene a los 10 minutos de efectuada la reacción; luego desaparece gradualmente. A posteriori se produce una tonalidad azul verdosa que no es proporcional al contenido de tartárico.

Técnica operatoria:

Se trabaja con 1 ml de solución incolora de la muestra y 1 ml de la misma muestra con el grado del testigo simultáneamente. Se agregan: 1ml de ácido acético glacial y 4ml de solución saturada de metavanadato de sodio. Se compara después de 10 minutos. Si se forma espuma, conviene agregar 1 gota

de éter para romperla.

En el medio en que se trabaja, la reacción da como resultado una coloración naranja que llega a su máximo en el lapso de 30 a 60 minutos. Más tarde se advierte la aparición de un precipitado rojizo.

--Para el Cítrico y Citratos

Reacción del Nitroprusiato de sodio. 24)

Técnica operatoria: A 5 ml de la solución acuosa preparada, se agregan 20 gotas de permanganato de potasio (e), se lleva a ebullición hasta decolorar. Se enfría. Se agregan 20 gotas de Nitroprusiato de sodio (f). Se mezcla y se hace caer lentamente gota a gota por las paredes del tubo mediante una pipeta, 1 ml de amoníaco concentrado, hasta formación de un anillo violeta, que pasa a azul y finalmente al verde; anillo que se observa en la zona de separación de ambos líquidos.

También en este caso se trabaja en paralelo, con soluciones que contienen 0.02g% de ácido cítrico.

Los resultados obtenidos son satisfactorios.

Discusión de Resultados:

La reacción con anhídrido acético y piridina arrojó resultados negativos para todas las muestras excluyendo los nos.: 4, 6, 7, 9, 14, 17, 19 y 23.

Se descartó la presencia de los ácidos en los casos en que dicha reacción fue negativa y se ensayaron sucesivamente las reacciones del metavanadato y nitroprusiato en las restantes.

Resultados obtenidos:

Dudosas de contener ácido tartárico: todas las muestras anteriormente señaladas, excepto la (19) que dio las reacciones del cítrico, aunque no en forma precisa.

Conclusión

Encontramos que los métodos ensayados no son satisfactorios ya que ofrecen bastante inseguridad. Sería necesario profundizar, este tema, para lo cual hemos iniciado ensayos de cromatografía descendente sobre papel Whatman N° 1 (25) utilizando como líquido de corrimiento: 1-pentanol - Solución 5M ácido fórmico(1:1). La falta de tiempo no permitió la puesta a punto de esta técnica con los ensayos de recuperación correspondientes. Queda entonces, como método tentativo, para la resolución de este problema.

Tema 4

L) INVESTIGACION DE CONSERVADORES DE COLOR: Acido Nicotínico y Ascórbico. Su probable estimación.

La niacina o ácido nicotínico ha sido patentado para usar como preservativo del color rojo en carnes.

La combinación del ácido nicotínico y la mioglobina de la carne produce un compuesto rojo descrito como un hemocromo en el que el ácido nicotínico está unido al Fe de la porfirina y a la globina. La nicotinamida también forma hemocromos. (26)

A) Determinación de ácido Nicotínico

Técnica suministrada por el Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología(27)

1) Principio

El método se basa en la extracción del ácido nicotínico con alcohol, su separación de otros constituyentes por cromatografía en placa delgada y reconocimiento por observación de las manchas a la luz UV. Las manchas se eluyen y en la solución resultante se determina el ácido nicotínico cuantitativamente por espectrofotometría.

En los análisis efectuados se omitió la evaluación cuantitativa, reemplazándola por una estimación semicuantitativa de ácido nicotínico y nicotinamida.

2) Reactivos

a) Alcohol etílico 96°.

b) Líquido de corrimiento

Acetona: Benceno: Metanol: Acido Acético. (44:56:16:4)

c) Solución patrón de ácido nicotínico 240mg/100ml

d) Solución patrón de nicotinamida 240mg/100ml

3) Material

a) Baño de agua (100°C)

b) Placas de vidrio (10 x 20cm) recubiertas con sílica gel HF 254 y activadas 10 minutos a 110°C

c) Cuba cromatográfica

d) Matraces de 10ml

e) Lámpara de luz UV de 254 m μ .

4) Técnica Operatoria

Se extraen 30g de la muestra preparada durante 30 minutos con 100ml de etanol 96° en baño de agua hirviente. Se filtra y el residuo se lava con etanol 96°. Los extractos se evaporan a casi sequedad y el residuo se disuelve en etanol 96°, llevando a volumen de 10ml. Se dejan reposar durante 1 hora.

Se siembran 50 μ l de dicha solución en las placas (b) en paralelo con 10 μ l de cada una de las soluciones patrón (c) y (d). Se desarrollan las placas en el líquido de corrimiento hasta unos 15cm del lugar de siembra (aproximadamente 1 hora). Se secan con aire caliente y se observan a la luz UV de 254 m μ , marcando las manchas evidenciadas.

Además se siembran 50 μ l de extracto de la muestra en investigación con el agregado de los conservadores para observar la influencia del medio sobre el comportamiento cromatográfico.

Se verificó que las manchas de ácido nicotínico y nicotinamida tienen valores de Rf distintos de las que provienen de otros compuestos no identificados del producto que corren en el medio usado.

5) Estimación semicuantitativa

Teniendo en cuenta que la concentración máxima admitida por nuestra legislación es de 150ppm de ácido nicotínico, en los 50 μ l sembrados habría como máximo 22,5 γ del ácido y que los 10 μ l de siembra de los testigos puros contienen 24 γ directamente la comparación del tamaño e intensidad de las manchas permite apreciar si la muestra analizada tiene una concentración

de ácido nicotínico y nicotinamida, mayor o menor que el límite máximo permitido.

6) Conclusión

El método es satisfactorio y permite una estimación semicuantitativa.

B) Determinación de ácido ascórbico (Vitamina C)

Se efectuó una búsqueda bibliográfica para establecer un método de análisis, pero dado que su determinación ofrece numerosas dificultades en un medio tan complejo como es el material con el cual se ha trabajado, en esta primera etapa, no se encaró la resolución de este problema.

RESULTADOS OBTENIDOS

Se analizaron veintisiete muestras de salchichas de diferentes marcas cuya composición química aproximada se indica en los cuadros 1 y 2.

CONCLUSIONES FINALES

1) Con respecto a la metodología

Las técnicas utilizadas para las determinaciones básicas fueron puestas a punto en forma satisfactoria, de tal manera que su aplicación no arrojó ninguna duda acerca de los resultados obtenidos.

Estas técnicas fueron las que se usaron para las determinaciones de: agua, cenizas, cloruros, nitrógeno total, materia grasa, creatinina, sustancias conservadoras (ácidos salicílico, benzoico, sórbico, p-hidroxibenzoico y sus ésteres, sulfitos) y ácido nicotínico.

En cuanto a las técnicas desarrolladas para las determinaciones de almidón, acidez, materia colorante, ácido cítrico y tartárico, si bien nos han permitido obtener resultados primarios, consideramos que, de acuerdo a los problemas presentados que se señalaron en cada oportunidad, tendrían que ser perfeccionados y ampliados.

2) Con respecto a los resultados obtenidos

Las salchichas tipo viena (Frankfurters) consumidas en la Rep. Argentina,* no difieren fundamentalmente desde el punto de vista de su composición química de las que se consumen en USA.

En el cuadro 3 figuran los valores encontrados en distintas publicaciones (28), (29) y (30): (I, II, III, IV, y V) y los obtenidos por nosotros (VI).

Las diferencias más notables se observan en el contenido de materia grasa, que es mayor para los productos argentinos, y en el de proteínas que es menor.

El tenor de agua, si bien es aceptable, como valor promedio, es muy elevado en algunas de las muestras analizadas.

(*) Capital Federal y Gran Buenos Aires.

DETERMINACIONES CUANTITATIVAS

N°	Forma de presentación	Componentes declarados	Agua %	Cenizas gr %	Cloruros en ClNa gr %	Hidrógeno total gr%	Proteínas gr%(N+6,25)	Acidez on H de C tot. expr. en el- midón gr%	Materia Latera Grasa gr%	S/A	
											1,6
1	Envasadas al vacío.	Carne porcina Carne vacuna Sal. Especies	64,0	3,7	2,7	1,6	10,2	2,2	1,6	15,7	43,6
2	Envasadas al vacío	Carne cerdo " vacuna	57,1	2,9	2,3	1,7	10,6	5,6	1,2	26,3	61,1
3	Envasadas al vacío	Carne cerdo " vacuna tocino	57,2	2,9	1,7	2,0	12,5	6,7	1,0	25,0	48,9
4	Sueltas	--	52,0	2,5	1,5	2,1	13,0	5,1	7,2	23,2	48,3
5	Envasadas al vacío	Cerdo vacuno	55,2	2,6	1,9	1,6	10,1	4,3	3,5	23,6	52,6
6	Envasadas al vacío	Vacuno cerdo especies	53,4	2,7	1,2	1,6	10,0	6,0	8,5	23,5	50,2
7	Envasadas al vacío	Carne vacuna " porcina Grasa " especies	52,3	3,9	2,7	1,5	9,3	6,5	3,5	25,6	51,6
8	Sueltas	-- Carne vacuna	57,6	2,6	1,8	1,6	10,0	5,8	6,6	20,5	48,4
9	Sueltas	Grasa de cerdo, especies	52,4	4,1	2,2	1,9	11,8	4,8	3,8	22,0	46,2
0	Sueltas	--	55,5	2,5	1,7	2,2	13,7	5,7	6,9	21,7	48,7
1	Envasadas al vacío	Carne vacuna " cerdo Grasa " vacuna especies/sal	64,5	2,5	1,8	1,6	10,0	6,4	2,2	19,6	56,3
2	Sueltas	--	51,6	2,9	1,8	1,9	11,8	3,0	6,1	24,8	51,2

uestra N°	Forma de presentación	Componentes declarados	Agua %	Cenizas gr. %	Cloruros expr. en ClNa gr%	Nitrógeno total gr%	Proteínas gr%(N*6,25)	Acidez en ml NaOHN	H de C tot. expr. en amidón gr%	Materia grasa gr%	Materia grasa s/s
13	Sueltas	-	51,9	2,7	1,6	1,5	9,3	3,6	9,8	24,5	50,5
14	Sueltas	-	59,3	3,2	1,7	1,6	10,0	2,5	8,4	20,0	49,1
15	Envasadas en lata	Carne vacuna sal/especies Nitratos y Nitritos	69,4	2,5	1,7	1,5	9,3	4,6	2,8	17,0	63,2
16	Sueltas	-	49,4	2,6	1,5	1,4	8,5	2,6	9,0	27,0	53,2
17	Sueltas	-	53,0	2,7	1,3	1,2	8,0	1,1	7,5	22,2	47,2
18	Sueltas	-	54,3	2,5	1,1	1,3	8,4	1,8	8,6	23,1	50,5
19	Sueltas	-	48,8	4,2	3,0	1,1	6,8	2,4	6,5	27,8	54,2
20	Sueltas	-	47,2	3,0	1,2	2,9	18,5	3,4	6,0	25,3	47,9
21	Envasadas al vacío	-	50,1	2,9	1,5	1,3	8,3	8,9	9,0	24,1	48,2
22	Envasadas al vacío	-	65,5	2,5	1,4	1,4	8,6	2,2	1,4	17,6	39,5
23	Envasadas al vacío	Cerdo vacuno Especies	45,8	4,0	3,0	1,5	9,3	2,0	3,9	29,8	54,8
24	Envasadas en lata	Carne vacuna sal/especies	71,9	2,4	1,8	1,6	10,0	3,4	1,9	10,3	36,6
25	Envasadas al vacío	Carne vacuna " de cerdo Grasa Aditivos	48,7	3,0	1,9	1,4	8,7	4,2	9,6	24,6	47,9
26	Envasadas al vacío	Carne vacuna Especies	57,4	2,7	1,2	2,1	13,1	5,9	5,7	19,0	44,6

27 No se realizó el análisis por encontrarse el producto en avanzado estado de descomposición.

DETERMINACIONES CUALITATIVAS Y SEMICUANTITATIVAS

Muestra N°	Reacción de Eber	Creatinina	Sustancias conservadoras (P)	Sustancia. s. Pecesustrantes Ac. Cítrico. Ac. Tartárico (P)	Conservadores Ac. Nicotínico	de color Nicotinamida	Lateria colorante agregada
1	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	- de 150ppm	No Contiene	No Contiene
2	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	- de 150ppm	No Contiene	No contiene
3	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	Contiene (**)
4	<u>Positiva</u>	Contiene	No Contiene	Presuntivo	No Contiene	No Contiene	No Contiene
5	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene
6	Negativa	Contiene	No Contiene	Presuntivo	- de 150ppm	No Contiene	No Contiene
7	Negativa	Contiene	No Contiene	Presuntivo	- de 150ppm	No Contiene	No Contiene
8	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	- de 150ppm	No Contiene	Contiene (**)
9	Negativa	Contiene	No Contiene	Presuntivo	- de 150ppm	No Contiene	Contiene (**)
10	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	- de 150ppm	No Contiene	No Contiene
11	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene
12	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	- de 150ppm	No Contiene	No Contiene
13	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene
14	Negativa	Contiene	No Contiene	Presuntivo	150ppm	No Contiene	Contiene (**)
15	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	- de 150ppm	No Contiene

100

Cuadro 3

	Humedad gr%	Cenizas gr%	Proteínas (Nx6,25) gr%	Grasas gr%
I	64,0	3,1	15.2	14.0
II *	Min.40.3	0,7	14.6	14.8
	Prom.57.2	3.4	19.6	18.6
	Max.64.8	8.1	26.9	25.9
III	52.2	2.6	8.7	20.4
IV	55.1	3.3	14.5	25.5
V	60.0	2.7	14.2	20.5
	Min.45.8	2.4	6.8	10.3
	VI** Prom.55.5	2.9	10.4	22.4
	Max.71.9	4.2	18.5	29.8

Con respecto al almidón y los componentes que figuran en el cuadro 2 no hemos encontrado datos estadísticos que nos permitan establecer comparaciones.

De acuerdo a las legislaciones vigentes en nuestro país, podemos señalar las siguientes discordancias con aquéllas:

- 1) Doce de veintiseis , o sea el 46% se exceden en materia grasa.
- 2) Cinco de veintisiete, o sea el 15% se encuentran en mal estado de conservación.
- 3) Cinco de veintiseis , o sea el 19% tienen agregado de materia colorante no declarada en el rotulado.

(*) Promedio de 8 análisis

(**) Promedio de 26 análisis

0

Este trabajo fue realizado por la Dra. Rosa Rosovsky de Cernadas, el Dr. Carlos G. Núñez, las Srtas. Elsa de Sá Souza y Silvia E. Rojas y el Sr. Guillermo Tarquini, en los laboratorios de CITECA, del sistema de Centros de INTI, en el predio de Liguete.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Methodes de Controle--Centre Technique de la Salaison de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, Jules 1969. 60, rue Caumartin - Paris - 9^e
- 2) Pharmacopoea, USA, XIII, Edition 811.
- 3) AOAC, 1965 (29.012)
- 4) AOAC, 1965 (23.005)
- 5) AOAC, 1965 (23.009)
- 6) Norma IRAM 14007, Instituto Argentino de Racionalización de Materiales
- 7) W. Glover, W. Kirschenbaum and Caldweel. Journal of the AOAC, Vol.49, N^o2, pág. 307-309 (1966)
- 8) A.L. Winton y K.B. Winton, Análisis de Alimentos, pág. 990 (1947).
- 9) Analyst 89, 142 (1964).
- 10) Las materias colorantes en los productos alimenticios . Ulaus Hordh (1941)
- 11) The Science of meat and meat products, pág. 88-95, 1960. AMIF
- 12) Doolittle, U.S. Dept. of Agric. Bur. of Chem. Bull. 65.
- 13) Lehmann, and col, Die Fleischwirtschaft, Vol 50 n^o 7 (1970)
- 14) K.Randerath, Dünnschicht - Chromatographie, 2, Auflage, Verlag Chemie, Weinheim(1965)
- 15) Food Tech. Vol. 17, 105 - 107, n^o 10 (1963)
- 16) Sci. Food Agr. 7, 534 (1956).
- 17) J. Rajama, P. Mäkelä, J. Chromatog. 29 (1967) 369-377.
- 18) Gossele, J.A; Srebrnik - Friszman, S. - J. Chromatog. vol. 23, n^o 2, pag.305 (1966).
- 19) Z. Lebensmitt - Unters, 115-534 (1961)
- 20) Roemnele, O., Arch. Lebensm. Hyg. 7, 278 (1956).
- 21) Schuller y Veen, Journal of AOAC, vo. 50 N^o 5, 1967, pag. 1127-1130
- 22) The utilization of animal fats, AMIF, USA, (1960)
- 23) Colorimetric Methods of analysis, SNELL and SNELL, 3rd. edition, vol. III, pág.382-385-390 y 398 (1953)
- 24) Farmacopea Nacional Argentina (1966)
- 25) Buch, M.L; Montgomery y Porter, W.L., Analytical Chemistry. Vol.24 pág. 489 (1952)
- 26) Food Sci. 34, 292-294 (1969)
- 27) N. Gorin y P. Schütz, Journal of Sci. of Food and Agriculture, 21,8, pág. 423-426. (1970).
- 28) Structure and Composition of foods,Winton, Vol. III (1937).
- 29) The Chemical Composition of foods, Mc Cance , R.A and Widdowson, E.M. (1947)
- 30) Sausage Seminar, Union Carbide Corporation, Food Products Division (1970)

Muestra N°	Reacción de Eber	Creatinina	Sustancias(*) conservadoras	Sustancias Secuestrantes Ac. Cítrico	Sustancias Secuestrantes Ac. Tartárico (*)	Conservadores de color Ac. Nicotínico	Materia colorante agregada
16	Positiva	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene
17	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	Presuntivo	-- de 150ppm	No Contiene
18	Positiva	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	-- de 150ppm	No Contiene
19	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	-- de 150ppm	No Contiene
20	Positiva	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	-- de 150ppm	No Contiene
21	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	-- de 150ppm	No Contiene
22	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene
23	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	-- de 150ppm	No Contiene
24	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene
25	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene
26	Negativa	Contiene	No Contiene	No Contiene	No Contiene	-- de 150ppm	Contiene(**)
27	-	-	-	-	-	-	No Contiene

(*) Sustancias conservadoras: sulfitos, ácido benzoico, sórbico, salicílico, ésteres.

(**) Como ya se ha indicado en la pág. la presencia de este ácido no está plenamente confirmada.

(***) Materia colorante vegetal liposoluble del tipo de los carotenoides o del rojú.