



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO BENZÓICO EN PRODUCTOS LÁCTEOS

Aurora de J. Garza, Lidia R. Naccha, Lorenzo Heyer, Noemí Waksman y Norma C. Cavazos

Departamento de Química Analítica. Facultad de Medicina.

Universidad Autónoma de Nuevo León (Monterrey, N.L., México)

E-mail: nocavazos@yahoo.com

Introducción

El avance tecnológico ha permitido incrementar la vida en anaquel de los alimentos lácteos, utilizando tratamientos térmicos, la pasteurización, así como mediante el empleo de conservadores.

Los conservadores empleados en productos lácteos son: formaldehído, agua oxigenada, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido paraoxibenzoico y ácido bórico. De éstos, el más utilizado es el ácido benzoico (AB) (1).

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, de tal manera 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 intervalo óptimo de acción es a valores de pH de 2.5 a 4.0.(2). El ácido benzoico puede encontrarse en alimentos en su forma ácida ó como benzoato de sodio.

La Administración de Alimentos y Drogas (FDA) define la dosis de referencia oral (RfD) 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 (308 mg diarios) de AB y estima una ingesta per cápita de 362 mg/día tanto de AB como de benzoato de sodio, lo que equivale a una RfD de 5.31 mg/kg/día, la cual sobrepasa la dosis establecida (3). Además, si se considera a un niño con un peso promedio de 12 kg estaría recibiendo una dosis 7 veces mayor a la recomendada.

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 prohíben su adición en leche fresca. Se permite su uso en un intervalo 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, mas no para la población infantil (4).

El AB es considerado como una sustancia GRAS (generalmente reconocida como segura), ya que no causa problemas de toxicidad en el hombre cuando se ingiere en las concentraciones normales. Sin embargo, la literatura reporta que a concentraciones elevadas (100 veces más la RfD) puede causar irritación del tracto digestivo y en situaciones extremas convulsiones epileptiformes (5). Por otro lado, no existen estudios de riesgo carcinogénico por exposición oral (6).

Diferentes métodos han sido desarrollados para la determinación de AB en alimentos, entre los que se encuentran la Cromatografía en Capa Fina (CCF) (7), la Espectrofotometría Ultravioleta (UV) (8), la Cromatografía de Gases (CG) (9) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) (10-15). De estos métodos, la CLAR es la técnica más utilizada para la determinación de AB en diferentes alimentos y otros productos.

El objetivo general del presente trabajo fue el desarrollo de un método analítico para la determinación de AB en diferentes productos lácteos con la finalidad de constatar que los niveles de concentración del mismo se encuentran dentro del permitido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-091-SSA1-1994) (16).

Material y Métodos

Equipo

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Beckman System Gold, con bomba modelo 126 y detector de UV visible con arreglo de diodos modelo 168. Fase estacionaria columna Fase inversa C₁₈ Beckman Ultrasphere ODS de 150 mm x 4.6 mm y 5 mm de tamaño de partícula. Cartuchos Sep-Pack C₁₈ (Waters). Longitud de onda de detección de 230 nm. Volumen de inyección de 20 mL.

Estándares y solventes

Estándar de AB grado analítico marca Fisher (99.9% de pureza). Los solventes agua, metanol (MeOH) y acetonitrilo (AcCN) fueron grado HPLC marca Fisher. Se prepararon las siguientes soluciones a partir de reactivos obtenidos todos de los laboratorios Merck: HC₂H₃O₂ (HAcO) 1M a pH de 4.5 y 4.2, H₂SO₄ al 10% (v/v), K₄Fe(CN)₆ al 15 %, Zn(C₂H₃O₂)₂ al 30%, HCl al 50% (v/v), NaOH 0.1 M

Condiciones Cromatográficas

Para llevar acabo la determinación de AB en los productos lácteos se procedió previamente a desarrollar y validar un método analítico. Para establecer las condiciones de análisis cromatográfico se trabajó con el estándar de 60 mg/L, empleando un diseño factorial en donde se mantuvo constante la fase estacionaria 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) HAcO 1 M a pH de 4.2-MeOH 60:40 b) HAcO 1 M a pH de 4.5-AcCN 80:20 c) Buffer de fosfatos 0.05 M a pH de 2.3-AcCN 60:40. Igualmente se probaron tres velocidades de flujo a 1.0, 1.3, y 1.5 mL/min. El diseño factorial que se empleo, para las diferentes condiciones experimentales de análisis cromatográfico se muestra en la Figura 1. Las mejores condiciones cromatográficas se seleccionaron en base al Número de platos teóricos (N), al factor de capacidad (k') y al factor de asimetría (FA); los cuales fueron calculados a partir de los picos cromatográficos (17).

Tratamiento Previo de la muestra y extracción en fase sólida

Las muestras fueron sometidas a dos etapas de procesamiento: la primera de tratamiento previo y la segunda de extracción en fase sólida, empleando cartuchos Sep-Pack C₁₈. Dos métodos de tratamiento previo de la muestra fueron probados, el método de desproteinización ácida y el método de ultrasonido.

Método de ultrasonido

Una muestra de 20 mL o 20 g se mezcló con 25 mL de NaOH 0.1 M y se sometió a ultrasonido por 15 minutos, se ajustó a un pH de 8 con HCl al 50%, para posteriormente someterla a desproteinización con 2 mL de ferrocianuro de potasio al 15% y 2 mL de acetato de zinc al 30%, enseguida se filtró al vacío, el filtrado se llevó a pH de 1 y de 3 con HCl al 50% y finalmente se aforó a 50 mL con agua grado HPLC (filtrado A).

Método de desproteinización ácida

Una muestra de 100 mL o 100 g se sometió a reflujo por 30 minutos con 15 mL de H₂SO₄ al 10%, 10 mL de ferrocianuro de potasio al 15% y 10 mL de acetato de zinc al 30%. La muestra digerida se filtró en embudo Buchner con papel filtro Wathman 40. El filtrado fue llevado a pH de 1 o 3, según el caso, empleando NaOH al 10% y finalmente se llevó a un volumen de 50 mL con agua grado HPLC (filtrado B).

Diseño Factorial

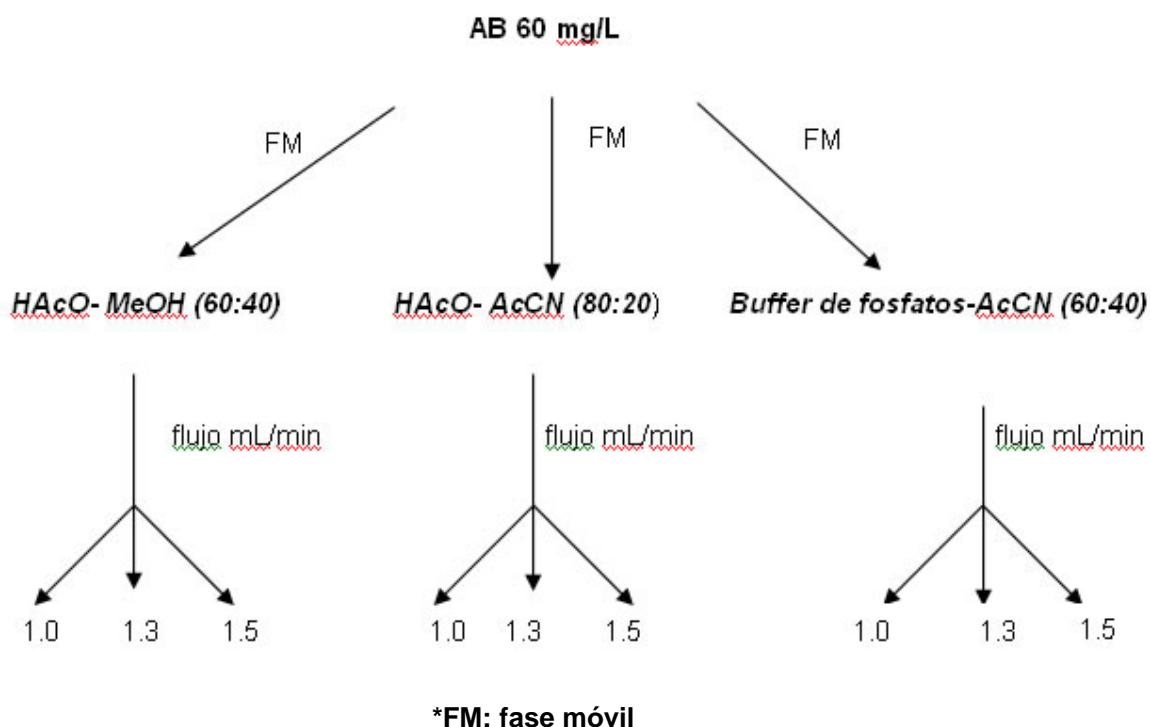


Figura 1. Diseño factorial empleado para establecer las condiciones experimentales de análisis cromatográfico.

Extracción en fase sólida

Los filtrados de muestra obtenidos por estos métodos fueron sometidos a la segunda etapa de extracción en fase sólida, durante la cual se probaron dos valores de pH del filtrado (1 y 3) antes de pasarlo por el cartucho de extracción, así como dos volúmenes de elución (1 y 3 mL) con AcCN. El proceso consistió en activar los cartuchos con 3 mL de metanol, enseguida se acondicionó con 5 mL de agua, posteriormente se pasaron los filtrados obtenidos de la muestra, se lavó con 5 mL de agua y finalmente se eluyó con AcCN. El esquema de trabajo se muestra en la figura 2. Las mejores condiciones de tratamiento previo y extracción en fase sólida se seleccionaron en base al porcentaje de recuperación y de reproducibilidad.

Validación

El método desarrollado fue validado tanto para el sistema como para el método, con los siguientes parámetros: linealidad, precisión, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ), exactitud y robustez.

Sistema Cromatográfico

Se prepararon estándares en un intervalo de concentración de 4 a 200 mg/L. Cada estándar se analizó por quintuplicado. Para determinar la linealidad se calculó el factor de respuesta (FR), el cual se define como la relación de la respuesta del detector sobre la concentración, y la desviación estándar relativa (RSD) de los factores de respuesta (FR) obtenidos. Así mismo, se determinó el coeficiente de correlación lineal (r) a partir de los datos de la curva. Los límites de detección y cuantificación se calcularon considerando, para el límite de detección, tres veces la desviación estándar del blanco, y para el de cuantificación diez veces esta desviación, para lo cual se aplicó el método descrito por Quattrocchi (18). Para evaluar la precisión del sistema se analizó el estándar de AB de 60 mg/L el cual se inyectó en cinco ocasiones consecutivas durante tres días y, con los datos de área del pico, se calculó la RSD.

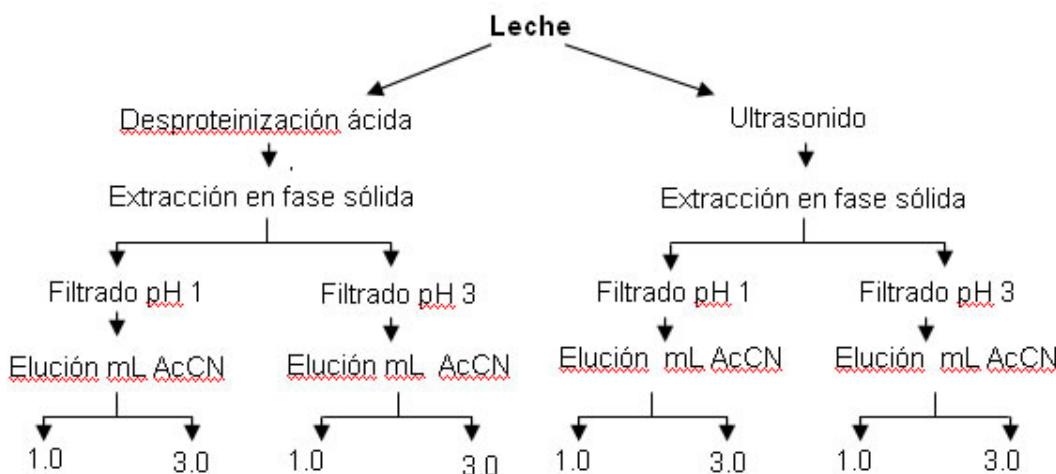


Figura 2. Diseño factorial para establecer las diferentes condiciones experimentales para el tratamiento previo de la muestra y extracción en fase sólida.

Método

La precisión del método se realizó tomando 10 muestras de un producto lácteo las cuales fueron procesadas de acuerdo con el método validado. Estas muestras se analizaron y de los cromatogramas resultantes se tomaron los datos de tiempo de retención y área del pico. La exactitud se obtuvo en base al porcentaje de recuperación: se tomaron ocho muestras de leche, cinco de ellas se adicionaron con 1 mL del estándar de AB de 100 mg/L y las tres restantes no. La cuantificación se realizó con la ayuda de la curva de calibración construida para los estándares. Para medir la robustez se realizaron pequeños cambios, tanto en la composición de la fase móvil como en el pH del HAcO. El estándar de AB de 60 mg/L, se inyectó en 5 ocasiones consecutivas bajo cada uno de los diferentes cambios realizados y, en cada uno de los picos cromatográficos resultantes, se calculó k' , N y FA. Los nuevos parámetros obtenidos, se compararon con los obtenidos bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas empleando una prueba t de Student.

Selección de Muestras

Se decidió determinar los niveles de AB en aquellos productos lácteos de mayor consumo entre la población del área metropolitana de Monterrey seleccionando así la leche pasteurizada, el queso Petit suise, el queso Panela, el queso Oaxaca, el queso Chihuahua y el queso Manchego. De cada uno de estos productos se eligió la marca más vendida en base a datos de inventario proporcionados por una importante cadena comercial del área metropolitana de Monterrey. Se colectaron 10 muestras al azar, en diferentes establecimientos comerciales, de cada uno de los productos lácteos a analizar, correspondientes a diferentes lotes. Las muestras se procesaron y analizaron con el método previamente validado. Los niveles de AB de cada uno de los diferentes productos lácteos fueron calculados y reportados en mg/L ó mg/kg (ppm)

Resultados

I.- Validación

De acuerdo con los resultados obtenidos bajo las diferentes condiciones experimentales para el análisis de AB por CLAR la mayor eficiencia se logró empleando como fase móvil de Ácido Acético 1M pH 4.5-Acetonitrilo 80:20 a un flujo de 1.3 mL/ min.

Para la validación del método los resultados obtenidos fueron los siguientes: intervalo de linealidad de 4 a 140 mg/L, un coeficiente de correlación lineal de 0.99 y una RSD de los FR de 15. El límite de detección fue de 2 mg/L mientras que el de cuantificación se estableció en 3.11 mg/L. La precisión del sistema presentó un RSD de 3.81 tomando como parámetro de medición el área.

Con las condiciones cromatográficas validadas se analizaron los productos seleccionados. La leche fue el primer producto que se analizó aplicando el esquema mostrado en la Figura 1.

La Tabla 1 muestra los porcentajes de recuperación del AB bajo las diferentes condiciones probadas. El método de tratamiento previo de ultrasonido resultó ser mejor que el de digestión ácida, tanto en la recuperación (67%) como en la reproducibilidad (RSD 3.3). El ajuste del pH antes de realizar el proceso de extracción en fase sólida, así como el volumen de elución, mostraron un importante efecto, con un incremento en la recuperación a pH de 1 y con 1 mL de AcCN para la elución.

El método cromatográfico resultó ser poco robusto ya que cuando se realizaron pequeñas variaciones, tanto en la composición de la fase móvil, como en el pH de la misma, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas tanto en los tiempos de retención como en el número de platos teóricos (eficiencia del método).

Tabla 1. Porcentajes de Recuperación del ácido benzoico bajo las diferentes condiciones de tratamiento previo y extracción en fase sólida.

Método	Desproteinización ácida				Ultrasonido			
	pH	1	3	1	1	3	1	3
Volumen de elución (mL AcCN)	1	3	1	3	1	3	1	3
% Recuperación	12.0	17.0	9.4	14.1	67.6	42.9	57.1	32.0
RSD	20.9	8.5	8.4	23.9	3.3	13.6	2.4	7.0

II.- Niveles de AB

Los niveles de AB determinados en leche y quesos se muestran en la Tabla 2. En la leche analizada no se detectó señal de AB y en el queso petit suisse los niveles encontrados sobrepasan los límites máximos permisibles. Los coeficientes de variación en todos los casos fueron menores del 20%, estos resultados cumplen con las guías de validación de métodos analíticos de la FDA (19).

Tabla 2. Niveles de AB en leche y quesos.

Producto	X ± 2 DE (ppm)*	RSD
Leche fresca pasteurizada	< 2	-----
Petit suisse	1,124.4 ± 135.2	6.0
Queso Panela	87.1 ± 23.3	17.4
Queso Oaxaca	40.8 ± 11.9	14.7
Queso Chihuahua	173.9 ± 34.7	9.9
Queso Manchego	209.8 ± 65.3	15.5

n = 10 *ppm = mg/L o mg/kg.

En la Figura 3 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.

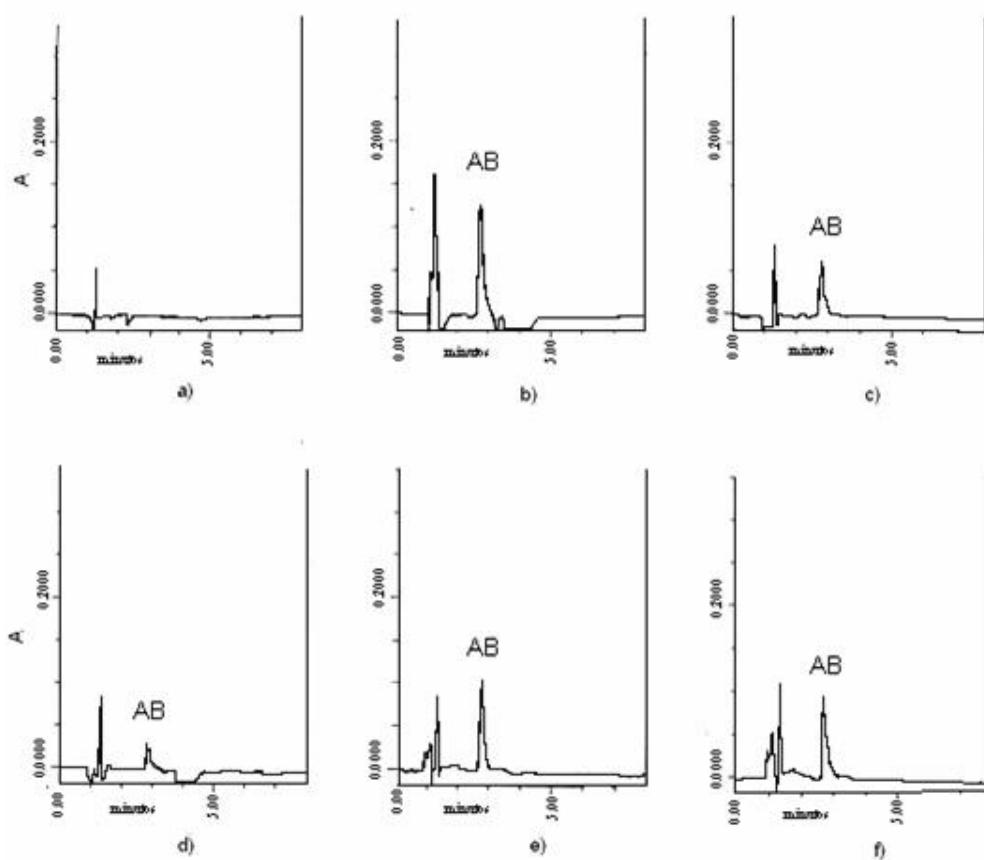


Figura 3. Cromatogramas de productos lácteos: a) leche, b) Queso Petit suisse dilución 1:5, c) Queso Panela, d) Queso Oaxaca, e) Queso Chihuahua y f) Queso Manchego (el eje de las ordenadas corresponde a la absorbancia y el de las abscisas al tiempo en minutos). Tiempo de retención de AB 2.8 minutos.

Discusión y Conclusiones

Hemos encontrado estudios similares de determinación de ácido benzoico en diferentes productos. Por ejemplo, Tfouni y Toledo, en un estudio realizado en Brasil, determinaron los niveles de benzoatos en bebidas carbonatadas, jugos de frutas, margarinas y productos lácteos como el queso y el yogur. Todos los productos presentaron niveles dentro de los intervalos permitidos (20). En nuestro caso, decidimos enfocarnos en productos lácteos ya que no existen métodos oficiales descritos para el análisis de ácido benzoico en este tipo de matriz. De manera que se decidió desarrollar un método y establecer las condiciones tanto para el tratamiento de la muestra (derivados lácteos) como para su análisis cromatográfico. Para el tratamiento de las muestras se modificaron las condiciones descritas por Riva Reyero (21).

Se optimizaron condiciones cromatográficas y se compararon con fases móviles referidas en la literatura (22, 23, 24). Nuestros resultados mostraron mejor eficiencia,

un mayor factor de capacidad y un factor de asimetría más cercano al valor de 1 (pico cromatográfico más simétrico) con la fase móvil de ácido acético pH 4.5 – acetonitrilo.

Con respecto a los resultados de validación, de acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration) y a la EPA (Environmental Protection Agency), una curva de calibración se considera lineal cuando el coeficiente de variación de los FR es menor a un 20%. En nuestro caso, esto se cumplió solo hasta el estándar de 140 mg/L, por lo que consideramos el intervalo de 4 a 140 mg/L.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994 (25) la leche no debe contener AB como conservador. Sin embargo, y debido a que en la actualidad presenta fechas de vencimiento amplias, decidimos verificar la ausencia de AB.

El esquema de tratamiento previo de la muestra y de extracción en fase sólida fue diseñado para tratar de obtener el mayor porcentaje de recuperación con las menores interferencias por parte de la matriz de la muestra (productos lácteos). Para la selección de las condiciones y en base al porcentaje de recuperación y de precisión, se trabajó con la leche. Seleccionamos este producto ya que, por un lado, no se encontró ácido benzoico al ser analizado y, por otro lado, resultó ser una matriz relativamente sencilla en comparación con los otros productos seleccionados.

Al utilizar el método de desproteinización con calentamiento a reflujo por 30 minutos, y un pH de 3 para la extracción, se obtuvieron menores porcentajes de recuperación con respecto a la utilización de ultrasonido y un pH de 1 para la extracción en fase sólida. Estos resultados son debidos a que durante la desproteinización ácida probablemente se pierde algo de ácido benzoico; por otro lado, a menor pH es mayor la proporción de ácido benzoico sin ionizar y, por tanto, mayor la retención en el cartucho de extracción, por ello es que a pH de 1 se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación con respecto a un pH de 3.

Tal como lo establecen las guías de validación de la FDA para un método analítico, la recuperación no necesariamente debe ser de un 100%, pero los resultados deben ser consistentes, precisos y reproducibles (26). En nuestro caso, la recuperación obtenida fue de un 67.6% y los resultados de precisión (RSD 3.26) permitieron proceder a procesar las muestras y cuantificar los niveles de AB en los diferentes productos lácteos. Se aplicó el factor de corrección correspondiente a los resultados obtenidos para obtener la concentración real de AB.

Los quesos analizados (Panela, Oaxaca, Chihuahua y Manchego), presentaron niveles de AB dentro de los límites establecidos por las Normas. Sin embargo, en el queso tipo Petit suisse, de alto consumo por la población infantil, se encontraron concentraciones de AB 1,124.4 mg/kg (0.27 %), valor que sobrepasa la concentración máxima permisible de este conservador en alimentos (0.05 a 0.10 %) (27). 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 la concentración de AB

encontrada en el queso tipo Petit suisse es mas de diez veces lo recomendado por la FDA. Es importante considerar este hallazgo que podría causar problemas de salud en la población infantil, siempre y cuando se abuse en el consumo de este producto.

Por todo lo anterior se puede concluir que se optimizó y validó un método cromatográfico para la determinación de ácido benzoico en productos lácteos. Debido a lo complejo de la matriz, fue necesario probar diferentes condiciones hasta obtener los mejores resultados de reproducibilidad y exactitud. Los niveles de este conservador en los productos lácteos analizados están dentro de los niveles permitidos excepto para el queso tipo petit suisse.

Resumen

Se realizó la determinación de Ácido Benzoico (AB) en diferentes productos lácteos con la finalidad de verificar que cumplan con los límites permitidos por la normatividad mexicana. El método utilizado fue la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Todos los quesos analizados estuvieron dentro de los límites (0.05 a 0-1%), excepto el tipo Petit suisse con un 0.27%. A pesar de que el AB es considerado como una sustancia segura, es importante tomar en cuenta este resultado, ya que su consumo en exceso puede causar irritación en tracto digestivo, así como una sensibilización química.

Palabras clave: ácido benzoico, productos lácteos, conservadores, ácido benzoico por HPLC, validación.

Abstract

Benzoic Acids levels (AB) in dairy products were determinate by HPLC. Mexican regulations allow the use of AB as an additive for these products at concentrations ranging from 0.05 to 0.1%. All the cheeses analyzed were inside this range except the Petit Suisse which showed 0.27%. It must be noted that even though AB is a substance generally regardless as safe, high doses can produce digestive irritation and chemical sensitising.

Key words: Benzoic acid, dairy products, conservatives, benzoic acid by HPLC, validation.

Referencias

1. Badui D. S.1999. Química de los Alimentos. Ed. Addison-Wesley Longman 455-463 pp.
2. Kirk R. S., R. Sawyer, H. Egan 1996. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. Ed. Continental S.A. de C.V. 70-76, 663-666 pp.

3. FDA (Administración de Alimentos y Drogas) 1973. Evaluation of the Health Aspect of Benzoic Acid and Sodium Benzoate as Food Ingredients. DHEW, Washington, D.C. Report No. SCGS-7. NTIS PB-223 837/6.
4. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. 18 de enero de 1988. Diario Oficial de la Federación.
México.
5. Valle V. P. 1991. Toxicología de Alimentos. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Mundial de la Salud 39-42 pp.
6. 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>.
7. AOAC. Official Method 967.15 March 1998. Benzoic Acid in Food. Thin Layer Chromatographic Method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 th edition. Volume II (37): 8-9.
8. AOAC. Official Method 960.38 March 1998. Benzoic Acid in Non Solid Food and Beverages. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 th edition. Volume II (37): 8.
9. AOAC. Official Method 983.16 March 1998. Benzoic Acid and Sorbic Acid in Food. Gas Chromatographic Method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 th edition. Volume II (37): 9-10.
10. Suárez M.A., D. Masferrer, L. Vázquez y F.Centrích. 1997. Análisis de Aditivos en Bebidas Refrescantes. Alimentaria. 35 (279): 43-48.
11. Hannisdal A. 1992. Analysis of Acesulfame-K, Saccharin, and Preservatives in Beverages and Jams by HPLC. Z. Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung. 194 (6): 517-519.
12. Mannino S. and M.S. Cosio. 1996. 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.
13. Riva Reyero M. C. 1987. Detección de Ácido Benzoico en Leche y Productos Lácteos. Alimentaria. 57: 57-62.
14. Pylypiw HM Jr., and M.T. Grether 2000. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. J. Chromatogr A. 23; 883 (1-2): 299-304.

15. Mikami E; T. Goto; T. Ohno; H. Matsumoto and M. Nishida 2002. Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 28 (2) 261-267.
16. Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Leche Pasteurizada de Vaca. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias. México.
17. Quattrocchi Oscar A., S. A. De Andrizzi y R. F. Laba. 1992. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. 39-64, 301-328 pp.
18. *Idem.*
19. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administraton (FDA). May 2001. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
20. Tfouni S.A. y M.C. Toledo 2002. Estimates of the mean per capita daily intake of benzoic and sorbic acids in Brazil. *Food Addit Contam.* 9 (7): 647-654.
21. Riva Reyero M. C., *Op.cit.*
22. AOAC. Official Method 967.15, *Op.cit.*
23. Suárez M.A., *et. al.*, *Op.cit.*
24. Mannino S. and M.S. Cosio, *Op.cit.*
25. Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994, *Op.cit.*
26. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, *Op.cit.*
27. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario, *Op.cit.*