

Posibilidades del Acido Benzoico y Benzoatos en la Industria de Conservas Vegetales

POR

GINES GUZMAN GIMENEZ

*Investigador del C. S. I. C. y Profesor de
Industrias Agrícolas de la Facultad de Ciencias*

Y

CONSUELO PEREZ SANCHEZ

Profesor adjunto de la Facultad de Ciencias

Las conservas vegetales más típicas se logran especialmente por la aplicación de calor a los productos contenidos en envases herméticos, pero el objetivo es que se mantengan inalteradas por tiempo indefinido en lo que afecta a sus características físicas, químicas y microbiológicas. Esto, en ocasiones, puede lograrse bien por uso exclusivo del calor, pero en otras se recurre a otros medios físicos o químicos, de modo que actúen en sinergismo con la acción térmica, hasta el punto que sólo basten condiciones suaves para lograr el fin pretendido. Especial significado tienen para ésto algunos agentes químicos (conservantes) (*) de cuya efectividad da testimonio el hecho de que por sí solos, aún en dosis pequeñas, pueden utilizarse para la preparación de ciertos elaborados.

El número de conservantes efectivos es pequeño pero aún éstos no se usan muchas veces con la debida corrección y en ello está el origen de algunos fracasos. Por otro lado existe una cierta tendencia a oponerse a la extensión del número de aditivos a los productos alimenticios, de ahí que las legislaciones de los diferentes países vayan reduciendo las tolerancias

(*) Creemos que para fines técnicos es más conveniente la palabra *conservante* que la de *antiséptico* o *antifermento* con que suelen conocerse desde el punto de vista científico y vulgar respectivamente. Para RABUSH [G. F. Rabush, J. Am. Pharm. Assoc., 16, 501 (1927)] un *antiséptico* es una substancia capaz de destruir o de inhibir a los gérmenes responsables de alteración en seres vivos; en líneas generales esta definición fue mantenida también por PATTERSON [A. M. PATTERSON, Am. J. Public Health, 22, 465 (1932)]. Con este término de antifermento parece como si se admitiera a priori que se lucha exclusivamente contra los microorganismos o gérmenes responsables de fermentaciones, o que se admite desde el principio, la tesis de actividad exclusiva contra enzimas o fermentos (denominación más antigua). Un significado más concreto tienen las palabras *germicida*, *fungicida*, *bactericida*,... o *fungistático*, *bacteriostático*,... que implican la idea de destrucción o de inhibición selectivas respectivamente.



en calidades y cantidad. Estas reducciones no son caprichosas, sino que en la mayoría de los casos hay motivos que lo aconsejan bien por sospecharse efectos perjudiciales contra la salud o por no haberse demostrado de modo innegable su inocuidad por procedimientos objetivos (1). Las legislaciones mejor reglamentadas (2) requieren antes de admitir o rechazar un nuevo antifermo el disponer de estas pruebas con resultados favorables e incluso que se suministren datos sobre características químicas y sobre procedimientos para su identificación.

En este reducido número de aditivos que se admiten encuentran un puesto sólido el ÁCIDO BENZOICO y sus sales, y de estas últimas destaca el BENZOATO SÓDICO, la más extendida fuente de BENZOICO. Pretendemos hacer una revisión de las características y aplicaciones del BENZOICO y BENZOATOS en la que una parte muy importante responde a nuestra propia experiencia tanto en escala de laboratorio como de fábrica, siempre en relación con su utilidad para la industria de conservas vegetales, en la que tenemos evidencia de efectividad de estos conservantes cuando son debidamente utilizados. Esto no impide que en algún caso nos refiramos a sus aplicaciones en conservas animales.

Recordamos que en conservas vegetales se dan alteraciones tanto ocasionadas por bacterias como por hongos y levaduras, si bien predominan las primeras en los envasados menos ácidos (verduras fundamentalmente) y las de hongos y levaduras en frutas (más ácidas) y en verduras acidificadas; no obstante, no puede establecerse este límite tan fácil en la localización de alteraciones. Tampoco es bastante con hablar de la simple división en bacterias, hongos y levaduras, sino que en cada grupo sería preciso recordar la existencia de diversos géneros y multitud de especies con sus peculiaridades en resistencia (termorresistentes, acidorresistentes), naturaleza de sus metabolitos más significativos (productores de carbónico, de sulfhídrico, de láctico, de acético, de propiónico, de butírico,...), ambiente requerido (aerobios, anaerobios, termófilos, psicrófilos, xerófilos, osmofílicos,...), etc., etc., lo que entorpece la forma de combatirlos en escala total. A esto se une la complicación, aún para los casos de poca variedad de gérmenes, de las posibilidades de adaptación de estos microorganismos (por ejemplo, anaerobios facultativos) invalidándose, en consecuencia, unas condiciones adoptadas que tal vez en otro momento eran buenas. Las posibilidades de adaptación se disminuyen recurriendo a agentes físicos o químicos de amplio espectro o a la

(1) *Procedures or the testing of intentional food additives to establish their Safety for use.* II Report del Comité conjunto de expertos sobre aditivos para alimentos, de la FAO y WHO, Roma, 1958.

(2) Por ejemplo, véanse *The Food Additives Amendment* (6 septiembre 1961) y aclaraciones complementarias de 6 de marzo de 1961, ambas de la Food and Drug Administration, de EE. UU

combinación de agentes de acción específica. En este último caso esperamos situar al ÁCIDO BENZOICO y BENZOATOS, a los que si bien se reconoce una excelente actividad, no debe olvidarse que ésta depende en gran parte, de las condiciones en que se usen. No puede atribuirseles carácter de panacea universal, más bien en ocasiones muestran cierta especificidad y, por ésto, han de usarse cuándo y cómo se esperen resultados propicios.

Experimentos de laboratorio

Con el fin de estudiar el comportamiento de las bacterias, hongos y levaduras, más frecuentemente encontradas en conservas vegetales alteradas, frente al ácido benzoico y benzoatos (*) se prepararon en primer lugar distintos medios de cultivo, unos usuales en nuestros laboratorios y otros preparados «ex profeso» a base de frutos y verduras de elaboración frecuente en España.

En nuestros primeros ensayos se prepararon varias series de tubos conteniendo, unos benzoato sódico, otros benzoato sódico más cítrico y otros ácidos benzoico, estableciéndose además diversos niveles en benzoico equivalente, aunque en los últimos se seleccionaron concretamente las concentraciones de 1,5 por mil y 1 por mil, ambas referidas a benzoico equivalente. También se han hecho experimentos con concentraciones superpuestas de ácido cítrico superiores a las necesarias para liberar el benzoico en el caso de utilizar sus sales, con el fin de lograr una acidificación adecuada, aumentando así la eficacia del conservante. En otras series de experimentos se han utilizado los productos comerciales *Molex 311* y *Molex 41* (**) que en definitiva son mezclas previamente dosificadas de benzoato sódico y de ácido cítrico, procurando en nuestro caso que las concentraciones en benzoico equivalente fuesen del 1 por mil.

Para hongos se han obtenido los cultivos por siembra directa y para bacterias y levaduras se han preparado previamente suspensiones de estos microorganismos de concentración determinada para lo que se hizo el control en cámara de Thomas de tales suspensiones y de sus sucesivas diluciones seleccionándose dos concentraciones o niveles de carga microbiana. Como es natural, desde el comienzo de este trabajo cada una de las series estudiadas incluye varios tubos testigo, sin conservante y en las

(*) Respecto a la utilidad del ácido benzoico y benzoatos en un plano general ya hay cierto estado de conciencia universal puesto que en la práctica se usan estos derivados como conservantes en algunos jugos, carnes, mermeladas, etc. e incluso muchas legislaciones los tienen permitidos de forma explícita. No obstante, es fundamental hacer un estudio concreto para los gérmenes de deterioro más típicos en conservas vegetales españolas.

(**) Se trata de nombres comerciales de dos productos a base de benzoato sódico y cítrico presentados al mercado por la firma Comercial «NAARDEN» Ibérica, S. A., con ánimo de facilitar la aplicación industrial en forma de compuesto único.

series con carga microbiana determinada los testigos van en las mismas condiciones.

En unas cuantas tablas se resumen a continuación los resultados obtenidos. En realidad no se han recogido todos, pero los datos son más que suficientemente representativos para demostrar la efectividad. Hacemos además la observación de que se ha procurado buscar condiciones de seguridad y, por tanto, los experimentos que aquí se describen reúnen tales condiciones, baste pensar para ello que las inhibiciones logradas se alcanzaron sin el concurso de la acción térmica y por tanto la conclusión o conclusiones a que se llega es que muchas inhibiciones podrían tenerse acudiendo a conservantes químicos solamente; este es el caso de la preparación de ciertas pulpas en barriles, en los que, por no ser totalmente hermético, su contenido quedaría expuesto a una contaminación posterior a su envasado, y para impedir su alteración se recurre a antifermentos que se utilizan desde el principio, evitándose la acción térmica que indudablemente siempre destruye parcialmente la textura. A continuación se irán dando las tablas-resumen de los resultados que se seguirán de algún breve comentario, cuando así proceda. La Tabla I resume los resultados de tres series de experimentos paralelos realizados sobre tres especies bacterianas frecuentes en conservas alteradas, habiendo usado un caldo de tomate de $\text{pH} = 6$ como medio de cultivo.

TABLA I

(caldo de tomate; $\text{pH} = 6$)

Especies bacterianas	Ácido benzoico 1 ‰	Benzoato sódico 1 ‰	Benzoato 1 ‰ + cítrico 1 ‰	Testigo
Lactobacilos	+	-	-	+
B. subtilis	+	-	-	+
B. megaterium	+	-	-	+

A primera vista resulta sorprendente que, precisamente los tubos que llevan ácido benzoico que es la especie activa, hayan mostrado crecimiento microbiano, pero en el curso de la realización de experimentos se esperaba este resultado puesto que existe gran dificultad para la disolución y aún para la distribución homogénea de este ácido cuya solubilidad es sumamente baja. De ahí la gran ventaja de utilizar benzoato sódico, muy soluble, y superponer la acción de un ácido que libere al benzoico en estado de fina división y lo deje distribuido homogéneamente en el material.

Este fenómeno se observa de manera más espectacular en experimentos de fábrica en los que la falta de eficacia del procedimiento seguido para usar el antifermo puede llevar, naturalmente si es que hay falta de esterilización, a hinchazón e incluso a explosión de envases. Cuando se trata de productos ácidos puede utilizarse el benzoato sódico con buenos resultados, pero; en general, es más conveniente la acidificación, por lo menos en cantidad suficiente para liberar el benzoico disponible. En la práctica, la forma más ventajosa de aplicación de benzoato es añadirlo inicialmente al envase, antes de introducir el contenido, utilizándolo disuelto, pues de esta manera todo el producto se impregna en esta sal liberándose después el benzoico al añadir, poco antes del cierre definitivo, la cantidad necesaria de ácido que deberá también disolverse previamente. En el caso de jugos muy ácidos sigue siendo interesante el utilizar el benzoato en forma disuelta y además echarlo poco a poco y con agitación para evitar que la precipitación de benzoico que inmediatamente tiene lugar pueda ser de tal grado que se deposite sin cumplir su cometido. Para el caso de productos que por su elevado pH requieren ineludiblemente la acidificación para liberar benzoico puede también recurrirse en caso extremo a añadir el benzoato sódico sin disolver distribuyéndolo en el fondo, porción media y en la superior del contenido de cada envase, haciendo que el producto espolvoreado así con benzoato se empape bien al agregarle el líquido de gobierno bien caliente, además de que se haga un precalentamiento intenso de los botes antes de agregar el ácido disuelto (generalmente cítrico), inmediatamente antes del cierre de envase.

A continuación, en la Tabla II, se recogen los resultados obtenidos con varias especies bacterianas frente a benzoato sódico más cítrico, ambos a 1,5 por mil, en dos medios de cultivo de diferentes pH, concretamente en caldo de guisantes de pH = 7 y en caldo de tomate de pH = 6.

TABLA II

Medios nutritivos: Caldo de guisantes pH = 7
Caldo de tomate pH = 6

Especies bacterianas	Medio de guisantes		Medio de tomate	
	Testigo	Benzoato 1,5‰ + cítrico 1,5‰	Benzoato 1,5‰ + cítrico 1,5‰	Testigo
Clostridium	+	-	-	+
Lactobacillus	+	-	-	+
B. subtilis	+	-	-	+
Clostridium	+	-	-	+
Streptococcus	+	-	-	+

Como ambos medios de cultivo tenían un pH elevado, se tenían ciertos temores de que la efectividad del conservante no fuese la suficiente ya que se admite, en general, que es la especie ácido benzoico libre y además a pH bajos la que en realidad actúa. Como los resultados fueron satisfactorios se procedió a repetir los experimentos disminuyendo la dosis de conservante hasta el 1 por mil, concentración que por otro lado, queda dentro de los límites autorizados en aquellos países que admiten de forma explícita en sus legislaciones el uso de benzoico o de benzoatos.

En las dos series de experimentos repetidos ahora, cuyos resultados se recogen en la Tabla III se ha utilizado una mayor variedad de gérmenes; los medios de cultivo han sido también los preparados a base de guisantes y de tomate.

TABLA III

Medios nutritivos: Caldo de guisantes pH = 7
Caldo de tomate . pH = 6

Especies bacterianas	Medio de guisantes		Medio de tomates	
	Testigo	Benzoato 1 ⁰ / ₀₀ + cítrico 1 ⁰ / ₀₀	Benzoato 1 ⁰ / ₀₀ + cítrico 1 ⁰ / ₀₀	Testigo
Tetragena	+	-	-	+
Lactobacillus	+	-	-	+
Bacilos I (tierra)	+	-	-	+
Bacilos II (tierra)	+	-	-	+
Clostridium	+	-	-	+
Bacillus subtilis	+	-	-	+
Clostridium	+	-	-	+
Cryptococcus	+	-	-	+

Como se observa, tales resultados son totalmente optimistas, puesto que para ninguna de las especies bacterianas puras, ni aún para las mezclas de bacilos del suelo ha habido crecimiento en los tubos conteniendo conservantes y sí en todos los testigos de uno y otro caldo sembrados y mantenidos en las mismas condiciones.

A continuación se dá la Tabla IV en la que se recogen los resultados conseguidos con los antisépticos comerciales *Molex 311* y *Molex 41* en comparación con los obtenidos con una mezcla de benzoato sódico y de ácido cítrico preparada «in situ», es decir, por adición directa de estos dos productos al caldo de cultivo, con precaución de que al ácido se añada cuando ya el benzoato está disuelto; todos al 1 por mil.

Como se verá entre las especies microbianas se ha incluido una levadura del género *Saccharomyces*. Es de destacar que los experimentos se han hecho en dos grandes series integradas cada una por grupos de seis tubos conteniendo todos ellos la misma especie y con idéntica concentra-

TABLA IV

Medios nutritivos: A) Agua de levaduras
B) Caldo de peptonal-carne-lactosa

Especies microbianas	«Molex 311»		«Molex 41»		Benzoato sódico + cítrico		Testigo	
	A)	B)	A)	B)	A)	B)	A)	B)
<i>Streptococcus</i>	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>Clostridium</i> sp.	+	—	+	—	—	—	+	+
<i>Saccharomyces</i>	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>Bacilos</i> (tierra)	—	—	—	+	—	—	+	+
<i>L. heterofer-</i> <i>mentativus</i>	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>Cl. perfringens</i>	—	—	—	—	—	—	+	+

ción. La serie segunda difiere de la primera exclusivamente en la concentración de gérmenes; cada grupo de tubos, y éstos individualmente, de la segunda tienen una concentración en gérmenes que es aproximadamente 5 veces superior a la de los correspondientes de la primera serie. Como no se obtuvieron diferencias en los resultados al variar la concentración en esta cuantía, no se ha destacado en la Tabla, por innecesario, que tales resultados corresponden a ambas series. Destaca que la coincidencia de resultados fue absoluta en uno y otro medio de cultivo de los dos empleados. Como al cambiar el caldo de cultivo cuando hay fallo de inhibición se dá para ambas concentraciones también, hay que pensar que tales fallos son consecuencia de las propiedades del germen y del medio, y no del grado de contaminación, al menos dentro del intervalo de concentraciones de gérmenes usadas. Debe hacerse la advertencia que en ambas series de experimentos las concentraciones usadas de microorganismos superan bastante a las que de manera normal aparecen en los casos prácticos.

Las cepas de microorganismos utilizadas se han logrado directamente de conservas alteradas. Así, los *streptococos* manejados procedían de un bote de tomate que estaba repuntado («flat sour») como consecuencia, en este caso, de la producción de láctico por los citados gérmenes; se han usado dos suspensiones bacterianas de estos gérmenes que contenían 6,5

millones/10 cc. en los experimentos de la primera serie y 26,8 millones/10 cc. en los de la segunda.

La cepa de *Clostridium* utilizada procedía de un elaborado enlatado, con signos de bombeo, que se había preparado a base de pimiento morrón en salmuera, después de desalarlo suficientemente, aunque no con demasiadas precauciones. Para los experimentos de la serie primera se usaron concentraciones de 6,5 millones/10 cc. de caldo de cultivo; para los de la segunda serie concentraciones casi 5 veces mayores (26 millones/10 cc. de caldo de cultivo).

La cepa de *Saccharomyces* se había aislado de una mermelada de elevado contenido en sólidos que presentaba signos de bombeo; era una cepa claramente osmofílica. En los experimentos de la primera serie se usaron concentraciones de 220 células/10 cc. mientras en los de la otra serie se usaron concentraciones de 1080 células/10 cc.

El inóculo heterogéneo que hemos denominado «*Bacilos* (tierra)» ha sido aislado en bloque extrayendo suelo de jardín. De estas formas bacilares se han usado dos diluciones, una para la serie primera que contenía 6,72 millones de células/10 cc. y otra para la segunda que contenía 26,88 millones de células/10 cc.

La cepa de *Lactobacillus heterofermentativus* se ha aislado de un bote de guisantes con claros signos de alteración. Para los experimentos de la primera serie se usaron concentraciones de gérmenes del orden de 5,61 millones/10 cc. y para los de la otra serie concentraciones más elevadas (28,05 millones/10 cc.).

La especie *Clostridium perfringens* había sido aislada de una conserva cárnica, concretamente de un pollo en su jugo, que tenía signos de alteración. Para los experimentos de la serie primera se usaron concentraciones de 5 millones/10 cc. y para los de la segunda serie concentraciones de 5,5 millones/10 cc.

Otro grupo muy interesante de experimentos es el que se ha hecho sobre cepas de hongos, también aisladas de frutas y verduras. Los cultivos se hicieron en tres medios nutritivos sólidos (agar-patata, agar-tomate y agar-Czapek). En la Tabla V se recogen los resultados con benzoato sódico y cítrico, ambos al 1 por mil.

En tales resultados queda manifiesta la efectividad del benzoato en medio ácido, al realizar la distribución correcta de ambos. No se tuvo fallo alguno en los ensayos.

TABLA V

Especies	Agar-patata		Agar-tomate		Agar-Czapec	
	Testigo	BzNa	Testigo	BzNa	Testigo	BzNa
<i>Acremonium</i> sp.	+	—	+	—	+	—
<i>Acrothecium robustum</i>	+	—	+	—	+	—
<i>Penicillium notatum</i>	+	—	+	—	+	—
» violaceum					+	—
» purpurogenum	+	—	+	—	+	—
» (monoverticilado)	+	—	+	—	+	—
<i>Aspergillus flavus</i>	+	—	+	—	+	—
» ustus	+	—	+	—	+	—
» awamori	+	—	+	—	+	—
» miyakoensis	+	—	+	—	+	—
» luchuensis	+	—	+	—	+	—
<i>Trichoderma album</i>	+	—	+	—	+	—
<i>Fusarium roseum</i>	+	—	+	—	+	—
<i>Monilia pruinosa</i>	+	—	+	—	+	—
<i>Alternaria humicola</i>	+	—	+	—	+	—
» tenuis	+	—	+	—	+	—
<i>Cladosporium</i> sp.	+	—	+	—	+	—
<i>Mucor</i> sp.	+	—	+	—	+	—

Otro grupo muy interesante de experimentos es el realizado utilizando como gérmenes de ensayo varias levaduras igualmente típicas en conservas deterioradas.

En primer lugar se hicieron varias series a base de dos cepas del género *Saccharomyces* y una de *Candida* en las mismas condiciones que acaban de indicarse para hongos, es decir, en medios sólidos de agar-patata, agar-tomate y agar-Czapec. Los resultados están en la Tabla VI y denotan efectividad absoluta de la concentración usada de benzoato sódico adicionado de cítrico a posteriori de su distribución, que fue la del 1 por mil en cada uno.

TABLA VI

Especies	Agar-patata		Agar-tomate		Agar Czapec	
	Testigo	BzNa	Testigo	BzNa	Testigo	BzNa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	—	+	—	+	—
» ellipsoideus	+	—	+	—	+	—
<i>Candida arborea</i>	+	—	+	—	+	—

Para comprobar si el benzoato tenía actividad en sí o si ésta era atribuible al benzoico exclusivamente se hicieron dos series de ensayos utili-

zando un medio nutritivo formado a base de agua de levaduras y de glucosa que tiene $\text{pH} = 7$.

En una primera serie se hicieron cuatro grupos de tubos, uno de ellos con carácter de testigo y los otros tres conteniendo respectivamente ácido benzoico al 1 por mil, benzoato sódico al 1 por mil y el cuarto benzoato sódico y ácido cítrico, ambos al 1 por mil, añadidos en el orden correcto. En otra serie con sólo dos grupos de tubos se apreció comparativamente el efecto del benzoato sódico al 1,5 por mil y el de esta concentración cuando además lleva otro tanto de ácido cítrico. No se consideró conveniente el intentar el experimento con benzoico al 1,5 por mil dada la dificultad de disolución de éste aún en la otra serie más diluída. Los resultados se resumen en la Tabla VII.

TABLA VII

Medio nutritivo: Agua de levaduras-glucosa, $\text{pH} = 7$

Especies	Testigo	BzH 1 ^o /1.000	BzNa 1 ^o /1.000	BzNa 1 ^o /1.000 Cit 1 ^o /1.000	BzNa 1,5 ^o /1.000	BzNa 1,5 ^o /1.000 Cit 1,5 ^o /1.000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	—	+	—
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	+	+	+	—	+	—
<i>Torula utilis</i>	+	+	+	—	+	—

Es de destacar el fracaso de los experimentos con ácido benzoico pese a ser ésta la especie que se considera como activa, aunque por otro lado no es de extrañar dada la dificultad de su disolución. Para la poca acción del benzoato sódico basta pensar en que se trabajó a pH neutro, en el que no había liberación de benzoico, independientemente de que en estas condiciones de pH el propio ácido tiene poca actividad. Sin embargo al acidificar debidamente los medios se observa efectividad tanto de la concentración del 1,5 por mil como de la otra más diluída.

Para contar con más resultados se utilizaron otros dos medios de cultivo: caldo de tomate-glucosa y caldo de guisantes-glucosa, ambos de $\text{pH}=6$. Se hicieron ensayos a dos niveles de conservantes, uno al 1,5 por mil y el otro al 1 por mil. En la Tabla VIII se recogen los resultados correspondiente al nivel alto.

Los resultados obtenidos con benzoato sódico (BzNa) al 1 por mil, sin y con cítrico, responden a lo esperado. Los de conservante no acidificado han mostrado fallo en algunos tubos, en cambio la serie a la que se agregó cítrico fue totalmente satisfactoria, es decir, no crecieron gérmenes en ninguno de los tubos

Los resultados de laboratorio, como se ha visto, han sido, en general, bastante halagüeños, sobre todo en los casos en que el ácido benzoico se ha formado «in situ» por adición sucesiva de benzoato sódico y cítrico.

TABLA VIII

Medios nutritivos: Tomate-glucosa, pH = 6
 Guisantes-glucosa, pH = 6

Especies de levaduras	Testigo	Caldo de tomate		Testigo	Caldo de guisantes	
		BzNa 1,5‰	BzNa 1,5‰ (Cit. 1,5‰)		BzNa 1,5‰	BzNa 1,5‰ (Cit. 1,5‰)
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Debariomyces globosus</i>	+	—	—	+	—	—
<i>Rhodotorula macerans</i>	+	—	—	+	—	—

En realidad, CRUÉS y RICHERT (3), por ejemplo, ya defendieron en su día que el benzoato sódico debía usarse en alimentos con pH = 4,0 ó menor para que fuese efectivo. En trabajos más recientes RAHN y CONN (4) defienden que el benzoico, salicílico y sulfuroso llegan a ser cien veces más efectivos en medio ácido que en medio neutro, llegando además a las conclusiones siguientes:

- a) sólo el ácido no disociado es antiséptico,
- b) queda inhibida la multiplicación de levaduras cuando la concentración de benzoico no disociado es del orden del 25 mg/100 ml (*),
- c) la toxicidad del benzoato sódico en disolución ácida se debe también a las moléculas de benzoico no disociado.

Aplicaciones en fábrica

El verdadero alcance de la utilidad de estos conservantes, desde el punto de vista industrial, se deduce de los resultados a que se llega en los problemas de fábrica. En este sentido existe cierta tradición en el

(3) W. V. CRUÉS y P. RICHERT, *J. Bact.*, 17, 363 (1929).

(4) O. RAHN y J. E. CONN, *Ind. Eng. Chem.*, 36, 185 (1944).

(*) RAHN y CONN observaron esos requerimientos de benzoico no disociado trabajando con *Saccharomyces ellipsoideus* a pH = 3,5-6,5. De salicílico a pH = 2,93-5,70 se requerían 4 mg/100 ml. de ácido no disociado y usando SO₃H₂ a pH = 1-4,97 sólo se necesitaban 0,4 mg/100 ml. estimando que los iones SO₃H⁻ no inhiben a esas levaduras aunque sí a *E. coli* a una concentración de 10 mg/100 ml. a pH = 6-8 y de 7 mg a pH = 2-3.



uso de benzoico y benzoatos (fundamentalmente el sódico y algo más aisladamente el magnésico y cálcico). Respecto a su efectividad se han dado opiniones diversas; otro tanto pasa en lo relativo a sabores extraños de modo que hay catadores que consideran que el benzoico imparte a los productos un sabor picante, astringente,... mientras otros atribuyen este efecto sólo al benzoato y, por último, los hay quienes opinan que ni uno ni otro modifican el sabor ni olor natural. A nuestro criterio es quizá la diferencia de sensibilidad de los catadores la que determina estas opiniones diversas. Por otro lado, suele admitirse que el sabor extraño es más bien inherente al grado de pureza de los productos en sí. En este sentido hay unas normas de carácter bastante amplio como son las de la F.A.O (5) sobre las condiciones de pureza, en particular de cada uno de los aditivos normales para alimentos, independientemente de las dadas por los diferentes pases. Por ejemplo, en Estados Unidos se considera, para el caso concreto del benzoico destinado a alimentos, que éste debe cumplir con las mismas exigencias que las previstas en la Farmacopea de aquel país; al producto que las cumple se le califica como de *grado U. S.P.* = (*United States Pharmacopeia*); se admite que el benzoico de este grado no imparte sabores extraños. En Italia el benzoico y benzoatos deben reunir las características previstas en las últimas disposiciones (6)

TABLA IX

Característicos	Ácido benzoico	Benzoato sódico
Presentación	Cristales blancos	Polvo blanco cristalino
Punto de fusión	121 - 123° C	—
Riqueza mínima en la especie	99,5 %	99,5 %
Impurezas máximas admisibles:		
Sulfatos	0,05 %	—
Arsénico	3 p.p.m.	—
Plomo	10 p.p.m.	—
Cloro orgánico	0,07 %	0,07 %
Substancias oxidables expresadas por el consumo de permanganato potásico N/10	0,5 ml/gr	0,5 ml/gr
Substancias volátiles (por desecación en estufa a 105° C)	—	1,5 %

(5) I Report del Comité Conjunto de expertos sobre aditivos para alimentos de la FAO y WHO, Roma, 1957.

(6) Decreto Ministerial de 19 de enero de 1963. Suplemento a la *Gazzetta Ufficiale* n.º 64 de 7 de marzo de 1963.

que en realidad abarcan a todos los aditivos permitidos en el país. En la Tabla IX hemos resumido estas exigencias para el benzoico y benzoato sódico que son las especies más utilizadas (*).

Nosotros podemos añadir que, en general queda disimulado bastante ante el sabor, la presencia de benzoato para la mayoría de los productos conservados. En los frutos y productos ácidos en general, el sabor ácido característico natural enmascara bien al benzoico o benzoatos y en las verduras y productos poco ácidos tal vez como consecuencia de los propios sabores de éstos, siempre muy característicos y muchas veces destacados. Por ello en nuestra experiencia de fábrica, cuando las circunstancias lo han aconsejado, no hemos tenido inconveniente en que se utilice el benzoato sódico (**), siempre con la acidificación conveniente, y previa advertencia a los usuarios de la necesidad de hacer el empleo de acuerdo con la legislación vigente en España o en los posibles países de destino (7).

A título de ejemplo enumeramos algunos de estos casos concretos, en los que de momento parece aconsejable su empleo al menos como medida de prudencia:

a) Elaborados de tomate al natural en grande envases (5 Kg) destinados al comercio interior de ultramarinos para su despacho al detall, en los que habría peligro de repuntado una vez abiertos, si la venta no es rápida y no se dispone de frigoríficos; de ahí la conveniencia de usar conservantes químicos mientras se mantengan estas costumbres comerciales.

b) Elaborados de pimiento en grandes envases con destino semejante al del tomate, en los que además se tiene el inconveniente de que por una costumbre comercial, no justificada técnicamente, se hace el embotado sin líquido de gobierno y sin tener en cuenta el elevado pH de este fruto

(*) Aunque menos empleados por la industria, en la disposición italiana también se establecen las características de los benzoatos potásico y cálcico. Para el primero éstas son: polvo blanco cristalino; riqueza mínima 74 %; no debe contener más de 0,07 % de cloro orgánico, ni materiales oxidables en cantidad que consuman más de 0,5 ml de KMnO_4 N/10 por gramo. Para el benzoato cálcico las características son: polvo blanco; cristalino; riqueza mínima: 83%; no debe contener más de 0,07 % de cloro orgánico; la materia orgánica admisible consumirá menos de 0,5 ml de KMnO_4 N/10 por gramo.

(**) Una razón poderosa para el uso de benzoato sódico es su gran diferencia de solubilidad con el benzoico. Así este último sólo se disuelve en agua fría a razón de 3,63 gr/litro; es algo más soluble en caliente y aumenta su solubilidad bastante en presencia de fosfatos y bicax. En cambio el benzoato sódico se disuelve hasta 625 gr/litro en agua a unos 25° C.

(7) En España para el mercado interior aún rige la Ley del Ministerio de la Gobernación de 8 de octubre de 1945 y para exportación la del Ministerio de Comercio de 16 de mayo de 1961 en lo que respecta a conservas en general y de 31 de julio de 1962 para derivados de agrios. Posteriormente la Orden de la Presidencia del Gobierno de 5 de marzo de 1963 aprueba las nuevas reglamentaciones técnico-sanitarias para zumos de frutas y otros, admitiéndose en ésta 1 y 2 por mil de benzoato según usos:

que en principio aconsejaría el uso de autoclave; por otro lado el comercio requiere una textura en estos frutos que es incompatible con una esterilización eficaz, por medios exclusivamente térmicos, al menos en la forma defectuosa en que se venían envasando (*) y de ahí la necesidad que, de momento, tenía la industria de usar benzoato sódico en sustitución del ácido salicílico que se usó en los primeros tiempos y para el cual hay más reparos legales y de tipo toxicológico. Conviene destacar aquí que algunos industriales se han limitado a sustituir el salicílico por benzoato sin tener en cuenta la necesidad de acidificar, lo que puede ser causa de fracasos. La adición de ácido (citrílico normalmente) libera el benzoico y baja el pH aumentando la actividad del conservante y la eficacia de la esterilización térmica a que el producto se somete.

c) Fritadas y pistos diversos en los que entran como componentes fundamentales pimiento y tomate, con o sin berenjenas, cuando éstos se emboten en formatos de gran tamaño. En estos casos no justifica el uso una dificultad de esterilización, ya que se puede hacer el envasado a gran temperatura sino sólo la precaución para cuando abierto el bote el material se exponga a alteraciones por un consumo no inmediato.

d) Elaborados de habas al natural y rehogadas en aceite cuando la esterilización se hace sin autoclave y fundamentalmente para envases grandes. No puede olvidarse el pH un poco elevado de éstas y en cierto modo el que la industria no tiene excesiva experiencia en el manejo de las habas, ya que el gusto por ellas se ha extendido últimamente.

e) Judías y guisantes esterilizados a baño de maría. Cuando éstos se preparan en formatos destinados a hoteles y otras instituciones colectivas puede darse también el caso de que no se consuma de una vez el contenido de un bote o de una serie de ellos, quedando expuesto a deterioro, que en este caso es más de temer por los casos de incidencia de botulismo que se han dado en otros países precisamente sobre estas verduras de manera fundamental. Además, por el elevado pH de las mismas, se requeriría siempre el uso de autoclave, del que muchas veces no se dispone en las fábricas conserveras cuya tradicional dedicación era la elaboración de frutas para lo que no es necesario (**). Es medida de prudencia para facilitar la esterilización, si se hace a baño de maría, y para prolongar la

(*) Se ha hecho un estudio en el Centro de Investigación de Frutos y Conservas de Murcia, sobre la translocación de materiales entre el pimiento y un líquido de gobierno de composición controlada que ha de suponer una mejora sensible respecto a los pimientos sin líquido de gobierno añadido.

(**) Cuando para mantener el color verde de los guisantes o judías se adopta el método de BLAIR [J. S. BLAIR y T. B. AYRES, *Ind. Eng. Chem.*, 35, 85 [1943]] que lleva consigo elevación de pH se hace imprescindible el uso de autoclave. En procedimientos en marcha en el Centro de Investigación de Frutos y Conservas de Murcia, con el mismo fin, se intenta poder utilizar indistintamente autoclave o baño de maría, aunque de la primera forma se tiene el problema más resuelto que de la segunda.

conservación del contenido después de abierto el envase, el usar un aditivo de la categoría del benzoato sódico combinado con acidificación. mientras ello no suponga transgresión de las leyes de alimentos salvo que hubiesen temores respecto a su inocuidad.

f) Pulpa de calabaza para elaboración de cabello de ángel. Su carácter de semielaborado, su escasísimo contenido en sólidos, su facilidad para el agriado o repuntado e incluso para ser pasto de levaduras del género *Saccharomyces*, cuando esta pulpa se envasa en botes de gran tamaño con la consiguiente dificultad de penetración de calor, justifican la costumbre de añadir algún conservante como coadyuvante a la acción térmica (*). La conservación de pulpa en estos envases es frecuente para prever los períodos de demanda la cual es variable en el gusto, en lo que respecta a presentación, de ahí que no pueda prepararse el cabello acabado desde el primer momento.

g) Pulpa de membrillo en barriles. Hay dos tendencias, una a conservar los membrillos troceados o enteros en barriles o depósitos (trujales), otra a realizar la molturación de los frutos e incluso a refinar la pulpa a través de una pasadora dejándola ya dispuesta para su utilización en la elaboración de carnes. Para la primera forma se utilizan preferentemente disoluciones sulfurosas o de alguna de las sales capaces de suministrar sulfuroso. Pero para las pulpas como tales quizá el método más extendido es el de conservarlas con benzoato sódico (del 1 al 1,5 por mil) como sustitución de la forma usada otras veces con salicílico. No obstante las mejores pulpas pueden obtenerse con una mezcla de metabisulfito potásico y benzoato sódico, prácticamente en la misma proporción que ahora se usa, agregando la misma cantidad de ácido cítrico para conseguir el doble efecto de liberar el benzoico que es el conservante propiamente dicho y el sulfuroso que actúa como antioxidante además de ser conservante; naturalmente la dosis que se requiere de este último al usar benzoato es más pequeña y su misión principal es evitar el pardeo de la pulpa. Si los frutos antes de la molturación se sulfitaron suficientemente (con SO₂ gas) puede bastar con el benzoato para las dos misiones, antioxidante y conservadora. Por último la eficacia más absoluta se ha obtenido añadiendo a la mezcla conservadora como tercer componente un 0,3 por mil de ácido sórbico.

h) Mermeladas y carnes. Para las primeras no se requiere conservante si éstas contienen un 65 % de sólidos como mínimo, como ocurre en las destinadas a mercados internacionales que desgraciadamente apenas si tienen significado todavía. Por otro lado en otros países estos altos nive-

(*) El mejor resultado se obtiene por la acción sinérgica de benzoato sódico al 1 por mil y ácido sórbico al 0,3 por mil, en presencia del cítrico suficiente.

les de sólidos se consiguen por adición de un mayor porcentaje de azúcar que el que la industria española acostumbra a utilizar. Las mermeladas de gran proporción de fruta, que son las frecuentes en España, muchas veces presentan un bajo contenido en sólidos, que es natural si no se dispone de concentradores a vacío ya que el hacerlos perder agua a baño abierto supone una total pérdida de aromas aparte del recocado indeseable. Para estos casos, si la industrialización se hace en grandes formatos con destino a instituciones colectivas o al despacho al detall, como parece ser que sucede en algunas regiones españolas concretas, puede convenir la adición de benzoato sódico al 0,9-1,0 por mil como máximo, sólo o combinado con un 0,3 por mil de sórbico, previamente a la adición final de cítrico que es usual en la elaboración normal aunque ahora se incrementa un poco en cuantía. Verdaderamente el conservante en este caso tiene una misión preventiva para mantener sin alterarse el contenido una vez abierto el envase, dado que sus pocos sólidos le hacen vulnerable.

Para el caso de carnes, la necesidad puede ser mayor si se preparan con un contenido en sólidos muy por debajo del 70 % que es el límite de seguridad, si bien en la mayoría de los casos las propias pulpas utilizadas para preparar el acabado suelen ya aportar el conservante, como sucede en las de membrillo. Si las pulpas se tenían en botes, como en el caso de las de albaricoque o melocotón puede ser necesario agregar benzoato sódico, solo o con sórbico, para aprovechar el efecto sinérgico, además de reforzar el contenido en cítrico, máxime teniendo en cuenta que las carnes y gelatinas de estas frutas suelen tener contenidos bajos en sólidos por prepararse a base de bastante fruta y de un coagulante muy enérgico que permita atrapar una cierta cantidad de agua para que el acabado tenga una transparencia que suele apreciarse como virtud por la mayoría de los consumidores.

i) Confituras. Estas son autoconservables pero en cambio durante el proceso de su elaboración pueden surgir alteraciones en los almíbares de concentración sucesiva que suponen cambios en el sabor que difícilmente se disimula en el estado final aún cuando éste no sea en sí vulnerable a los microorganismos de nueva llegada o incluso suponga una situación tóxica para los que el producto lleve como consecuencia de las alteraciones en las fases iniciales.

j) Derivados de aceitunas. Es conocida la autoconservación de las aceitunas aderezadas o encurtidas como consecuencia de los metabolitos de la fermentación láctica, en presencia de salmuera adecuada, no obstante para la presentación definitiva de ciertas formas de aceitunas tales como las rellenas con anchoa, pimiento o almendra en las que hay una elevación de pH y la incorporación de productos más vulnerables suele

requerirse la colaboración de conservantes químicos ya que no es posible, por la naturaleza del producto principal, al recurrir al calor. En España era tradicional el uso de salicílico y ahora hay tendencia a sustituirlo por benzoato reforzado con cítrico ya que éste exalta la llamada «rubicundez», de la aceituna (*). Un elaborado especial, a cuyo desarrollo hemos contribuido, es la pasta de aceitunas destinada a la preparación de canapés y otros aperitivos, que como tampoco puede someterse a esterilización térmica requiere una conservación permanente por métodos químicos; el método más económico ha sido el de la utilización conjunta de benzoato sódico como principal, sórbico, como coadyuvante, y láctico, como acondicionador de pH y por el poder conservante selectivo que le atribuimos y tenemos probado; este elaborado de aceitunas se ha comercializado con éxito gracias al esmero que se tiene en su fabricación por parte de la firma productora. Se aprovecha la ocasión para destacar que en general el triunfo de la puesta en marcha de nuevos métodos a cuya generalidad no escapan los conservantes, puede depender del cuidado y pulcritud con que se realice.

k) Jugos de frutas. El creciente empleo de éstos y su pH tan favorable para la actuación de algunos conservantes químicos, ya que tampoco en este caso puede recurrirse a una acción térmica prolongada, de ahí el empleo preferente de la esterilización o pasteurización relámpago, requiere un comentario de la aplicación de benzoatos para jugos, lo que concuerda con el gran número de publicaciones científicas que tratan de su utilidad para jugos (8). Por ejemplo, está probado que los jugos de manzana, obtenidos en condiciones bastante asépticas, de modo que el grado de contaminación microbiana sea bajo, pueden mantenerse bien con niveles de 0,5-0,75 por mil y aún con menos, sobre todo en los jugos de manzanas ácidas, si bien la seguridad es mayor manteniéndolos a 0° C, de tal modo que se prolonga la vida de los jugos hasta unos 6 meses en esas condiciones; en jugos muy contaminados se requiere ya un 1 por mil (*) y en la opinión de los menos confiados la autoconservación indiscutible sólo se obtiene por el 3 por mil. También los jugos de uva pueden

(*) Sin quitar la importancia y buenas cualidades del ácido cítrico para estos comestibles deseamos resaltar que en el Centro de Frutos y Conservas de Murcia se está haciendo un estudio exhaustivo de las posibilidades del ácido láctico para este comestible, con resultados hasta ahora muy alentadores.

(8) H. C. GORE, U. S. Dept. Agr. Bur. Chem Bull., 118, 1 (1908); P. TONDUZ y P. CASTÁN, Landw. Jahrb. a. Schweiz, 1 (1925); C. R. FELLER, Fruit Products, J. 9, 113 (1929); A. OSTERWALDER, Landw. Jahrb. a. Schweiz, 43, 97 (1929); G. F. POE y J. T. FIELD, Fruit Products J. 27, 112 y 123 (1947); G. F. POE, R. C. MECHAN y B. H. LINCOLN, Univ. Colorado Studies, 17, 1 (1929); R. G. MORSE, Food Research, 16, 1 (1951); etc.

(*) En Estados Unidos, por ejemplo, el benzoato sódico es el conservante más generalizado para el jugo de manzana y la concentración más usada la del 1 por mil.

requerir concentraciones hasta del 3 por mil para su conservación, sin embargo en frutos de pH más bajo, como CRUSSL, RICHERT e IRISH (9) demostraron es más que suficiente con un 1 por mil.

Conviene destacar que para jugos en barriles se utiliza con frecuencia el sulfuroso, o sus sales, que tiene la doble misión de ser antiséptico y antioxidante; para la primera función se requiere una concentración de al menos un 0,1 % pero para la segunda bastaría con el 0,02 %. Un efecto especial muy interesante puede obtenerse con benzoato sódico como antiséptico y con sulfuroso o una fuente de él, en pequeñas dosis, en calidad de antioxidante. Esta forma combinada de utilización extendería el uso de benzoato para conservación de algunos jugos especiales, como son los cítricos, en los cuales no se utilizaba con mucha frecuencia debido a que este conservante no tenía en sí función antipardeo, ni impedía la pérdida de vitamina C que es el antioxidante natural de estos jugos. Sin embargo en los concentrados de cítricos muy azucarados, utilizados como base de refrescos y que por tanto se consumen diluïdos, está muy extendida la utilización de benzoato. La mayoría de las legislaciones preven el empleo de benzoato sódico para jugos de frutas y muy concretamente para estos jarabes base de bebidas refrescantes. Para el caso de bebidas ya preparadas, al menos en las llamadas carbónicas, se requieren concentraciones menores de conservante, bastante en muchas ocasiones con un 0,05 % (*), supuesta la hermeticidad de los envases.

Se insiste en que para la utilización de benzoato en jugos o derivados de éstos debe disolverse previamente en un poco de agua o jugo neutralizado repartiendo esta disolución en el seno del jugo a conservar. Aunque los jugos de frutas suelen tener un pH adecuado para la liberación de benzoico y para que éste actúe, no viene mal insistir una vez más en la necesidad de asegurarse que la acidez del medio sea suficiente. Esto es tanto más fundamental cuando los productos son más ricos en proteínas pues parte del benzoico se combina con estas substrayéndolo de su misión conservante, de ahí la conveniencia de acidificar con un ácido más fuerte, como ya defendieron PERRY y BEAL (10) para que éste sea el que se combine preferentemente, a la vez que incline el equilibrio hacia la formación de la especie benzoico no disociada que es la forma activa.

1) Otros productos.—Como complemento a los ejemplos dados de aplicación a conservas vegetales, y por su afinidad, se refieren unos casos simples de utilización para mantener en buen estado productos del reino

(9) W. V. CRUSSL y P. H. RICHERT, *J. Bact.*, 17, 363 (1929); W. V. CRUSSL, P. H. RICHERT y J. H. IRISH, *Hilgardia*, 6, 295 (1931).

(*) El carbónico incrementa la eficacia del benzoato contra las esporas de *B. subtilis* y sin duda frente a otros gérmenes.

(10) M. C. PERRY y C. D. BEAL, *Ind. Eng. Chem.*, 12, 253 (1920).



animal. Destaca el caso de los llamados hielos germicidas, uno de los cuales, muy eficaz, es el que se prepara por congelación de una disolución acuosa de benzoico al 0,1 % ya que ésta forma una mezcla eutéctica de punto de fusión $-0,03^{\circ}\text{C}$; aunque este hielo también sería útil para mantener ciertos productos vegetales, su utilización fundamental es para pescado, habiéndose logrado mantener éste varios días sin que se forme trimetil amina. Una buena revisión sobre hielos germicidas ha sido hecha por DUNN (11).

También son interesantes los trabajos de FELLERS y HARVEY (12) sobre la utilización de salmueras conteniendo benzoico o benzoatos de sodio o magnesio (0,15-0,5 %; pH = 4-4,5) para la conservación de filetes de anchoa, arrollados o no; en realidad suele realizarse una inmersión momentánea en estas disoluciones con lo que los filetes retienen sólo una pequeña cantidad del conservante propiamente dicho.

También puede referirse el trabajo de TARR y SUNDERLAND (13) en el que éstos encuentran que los filetes ahumados mantienen mucho mejor su calidad cuando se sumergen en una salmuera al 20 %, que contiene ácido benzoico.

Interesantísimos son también los trabajos de PISKUR y STANSBY (14) sobre el almacenaje satisfactorio de almejas recién cogidas, durante 12-13 días, en una salmuera del 3,5 % conteniendo 0,1 % de benzoato sódico y manteniendo la vasija correspondiente en hielo machacado.

También existen referencias concretas a la utilización de benzoico y derivados, a dosis bastante elevadas, para conservar batidos de huevos, con o sin aliños, previéndose en la mayoría de las legislaciones estos casos. Nosotros podemos referir como contribución personal que hemos desarrollado industrialmente diversas salsas (mayonesas, tártaras, etc...) y cremas (anchoas, sobrasada, salchichón, queso, aceitunas, etc.), con categoría comercial de semiconservas, aunque por la estabilidad lograda podrían considerarse como reales conservas; la estabilidad se ha logrado con una adecuada combinación de benzoico y benzoato con sórbico, cítrico y láctico.

De ninguna manera se ha pretendido hacer una exposición exhaustiva de aplicaciones pero sin duda los ejemplos dados dan idea de la amplitud de posibilidades.

(11) C. G. DUNN, *Food Technol.*, 11, 371 (1947).

(12) C. R. FELLERS y E. W. HARVEY, *Food Research*, 5, 1 (1940).

(13) H. L. TARR y P. A. SUNDERLAND, *Progress Reports*, Pacific Coast Sta. núm. 37, 7 (1938).

(14) F. PISKUR y M. E. STANSBY, *Commercial Fisheries Review* 8 (núm. 4), 5 (1946).

Comentarios sobre la forma de actuación

La acción de un germicida, en general, puede estar relacionada:

- a) Con una intervención en el mecanismo genético.
- b) Con un efecto destructor o modificador de la membrana celular, que en sus condiciones normales determina el intercambio entre el interior y el ambiente.
- c) Con una alteración del equilibrio o de la localización normal de los distintos enzimas y sistemas enzimáticos del protoplasma y/o núcleo, dependiendo de la intensidad del o de los disturbios el que se produzca la inhibición parcial o completa de la actividad celular. Como señala RAHN (15) una célula está técnicamente muerta, aunque no biológicamente, en cuanto ha perdido su capacidad reproductora, por esto cuando se usa un conservante químico basta lograr ese objetivo, o incluso en ocasiones es suficiente conseguir una lentificación de la actividad reproductora.

Sobre la posibilidad de que el efecto fundamental esté relacionado con una ingerencia en el proceso de multiplicación hay un hecho interesante. Así, las curvas de supervivencia, obtenidas representando en ordenadas el número de gérmenes que resisten a la acción de un germicida y en abscisas los tiempos en que ésta se ejerce son claramente logarítmicas (si el n.º de supervivientes se substituye por su logaritmo se obtienen rectas), de gran analogía a las que en Cinética se obtienen para reacciones de primer orden; esto hace pensar que la inhibición depende de la acción sobre una o cuando más de dos o tres moléculas por germen. Esto permite explicar la acción inhibitoria como un efecto sobre los genes o unidades hereditarias de los gérmenes, que estarían constituidas por una o dos moléculas de proteínas, bastando en realidad con que el efecto desnaturizante se ejerciera sobre uno de los genes, el realmente vital, no siendo preciso que se deterioren las restantes unidades hereditarias. El microorganismo con el gene fundamental alterado es en realidad un «mutante letal», incapaz de sintetizar ciertos materiales y mucho más vulnerable al medio ambiente o a condiciones superpuestas (por ejemplo, a la acción térmica). En la opinión de DELBRÜCK (16) la lesión genética es consecuencia de una irrupción del agente químico en el equilibrio resonante establecido normalmente entre formas radicales y formas totalmente deshidrogenadas y que es intermedio fundamental en la síntesis autocatalítica de polipéptidos. Los agentes químicos «no fisiológicos», es

(15) O. RAHN, *Byodynamics Monographs*, núm., 3, Normandy, Mo. (1945).

(16) M. DELBRÜCK, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 9, 122 (1941).



decir, ajenos a los que integran las células, intervienen tanto más fácilmente cuanto más parecido tengan con los que tienen en ellas misión fisiológica normal.

La segunda posibilidad, influencia sobre la membrana celular, juega sin duda también un gran papel en muchos casos, en especial en el de los agentes tensoactivos puesto que destruyen la semipermeabilidad de la membrana, permitiendo la salida de algunos materiales del citoplasma aún a temperaturas bajas. Por otro lado la alteración de la tensión superficial puede traducirse en un cambio de localización y aún de orientación en ciertos enzimas respecto a sus correspondientes substratos, desencadenando reacciones indeseables o impidiendo las normales. Los agentes microbicidas conviene contengan en su molécula una porción hidrófoba (repelente al agua) y otra hidrófila (afinidad para el agua) dependiendo la actividad, por un lado, de la capacidad para concentrarse en las proximidades de la célula microbiana a destruir y por otra de la toxicidad específica del agente.

El tercer aspecto desde el que se puede enfocar la acción de los agentes químicos es el de interferencia con la actividad enzimática, la cual depende del carácter coloidal del enzima (debido fundamentalmente a una proteína soporte) y de la naturaleza del grupo o grupos activos que posee (parte prostética). Ahora bien, la interferencia, desde un punto de vista general, puede estar ligada a un fenómeno de *desnaturalización* (efecto salino, acción de agentes humectantes, modificación de pH con gran separación del punto isoelectrico, etc.) ó de *inhibición química* propiamente dicha que a su vez puede ejercerse sobre la propia proteína soporte o sobre los grupos prostéticos. Son acciones sobre el soporte las ejercidas por los agentes oxidantes, cuando las inhibiciones son reversibles, es decir, cuando cabe la reactivación por efecto de agentes reductores (*); las inhibiciones enzimáticas causadas por envenenamiento con metales pesados (cobre, mercurio, plata) y semimetales (arsénico, bismuto) aún en trazas; las inactivaciones por alquilación de grupos -SH con iodoacetatos y bromoacetatos de alquilo; la inhibición por diversos reductores (sulfuroso, sulfhídrico, cianhídrico (**)) formaldehido, etc.) de enzimas con el grupo funcional -S-S-, siempre que éste se escinda irrever-

(*) Verdaderamente la acción inhibitoria se ejerce por efecto sobre los grupos -SH responsables de la especificidad del enzima afectado. Si hay reactivación se deberá a regeneración de los citados grupos. Es interesante destacar que de unos 40 enzimas catalogados por SINCLAIR [T. P. SINCLAIR, *Brewer Digest*, 20, 85 y 104 (1945)] el 75 % son de esa naturaleza.

(**) La acción inhibitoria del cianhídrico y otros puede deberse aún con más frecuencia a un efecto complejante o enmascarante sobre ciertos iones metálicos fundamentales para enzimas concretas.

siblemente; la de enzimas con grupos fenólicos, por acción de varios agentes químicos tales como los esterificantes y acilantes, cetenas, iodo, nitritos, etc.; la de enzimas con grupos amínicos por efecto de agentes capaces de reaccionar con tales grupos (epóxidos, formaldehído, cetenas óxido de carbono, etc.).

Naturalmente, las mayores interferencias surgen cuando los agentes químicos reaccionan con los grupos prostéticos, en los que verdaderamente radica la especificidad, de manera competitiva y con éxito respecto o frente a la parte proteica. También otras veces la razón de interferencia está en una competición entre el agente químico y el sustrato frente a la enzima, bien en su conjunto o al menos respecto a su superficie activa, durante la fase que puede llamarse de aproximación, que es previa a la de acción enzimática propiamente dicha. Es natural que el efecto de los agentes químicos sea más ostensible cuanto mayor semejanza estructural exista entre éstos y los sustratos, si el mecanismo es del primer tipo, o el efecto dependerá de la afinidad hacia estos sustratos si es el segundo tipo el que impera. El efecto depende también en parte de la concentración a la que se encuentre el aditivo.

Merece la pena destacar que igualmente pueden interferir en los procesos enzimáticos aquellos productos de naturaleza idéntica a los que resultarían como finales en una reacción enzimática normal ya que tales reacciones cesan cuando en el equilibrio se alcanzan concentraciones límite.

Después de estas consideraciones de carácter general sobre la actuación posible de los conservantes químicos haremos otras procurando enmarcar la forma de actuación posible del benzoico y benzoatos, en realidad en cuanto éstos son fuente del primero.

Verdaderamente desde el punto de vista teórico, no es previsible una exaltada especificidad para la actuación del ácido benzoico, con sólo un grupo funcional $-\text{COOH}$ unido al resto hidrófobo, a la manera de los compuestos de acción general (no específica), como pueden ser anilina y fenol, de cierta semejanza estructural. Sin embargo en la bibliografía se describen casos de especificidad de éste para la inhibición de determinados procesos de células bacterianas. En un plano más amplio, sobre gérmenes íntegros, nosotros mismos hemos encontrado en experimentos de laboratorio algunos fallos de inhibición para gérmenes concretos y éxito en otros, pudiendo superarse aquellos por mayores concentraciones. Afortunadamente no encontramos demasiada especificidad en cuanto a clases de gérmenes ya que los éxitos se han tenido con bacterias, hongos y levaduras, aunque el sentir general es que la eficacia para estas clases



es creciente en el orden dado. Como en conservas vegetales la variedad de gérmenes posibles es amplia es preferible que la especificidad no sea muy manifiesta.

Consecuencia de la falta de especificidad es la proporcionalidad indudable entre efecto y concentración, como se prueba en los experimentos de laboratorio, en los resultados de fábricas y en la información que se tiene, a la que hemos hecho referencia, del uso práctico de concentraciones crecientes para aumentar la seguridad, pese a que sin duda las dosis utilizadas en principio debían ser más que suficientes, en valor absoluto. Pero no puede olvidarse, que la distribución del benzoico, al igual que la de otros muchos, depende de su coeficiente de reparto, que determina la relación de concentración entre el ambiente (más o menos acuoso) y el material lipóideo que integra la célula a destruir, fundamentalmente el que forma parte de la membrana celular, puesto que de este material depende la fijación en la célula y el paso a su través del antiséptico hasta que éste alcance puntos vitales.

Repetidas veces hemos destacado la influencia favorable de los pH bajos sobre la actividad del benzoico, lo que hemos comprobado continuamente en nuestra experiencia industrial. En realidad esto es conocido desde mucho tiempo y son bastantes los trabajos que se concretaron a este estudio (17). El efecto del pH se traduce fundamentalmente en la inclinación del equilibrio de disociación hacia la forma no iónica que es muy liposoluble en comparación con los aniones benzoato; este efecto era previsible. En trabajos para comprobar este supuesto VON SCHELHORN (18) ha buscado la relación de proporcionalidad entre concentración de benzoico no disociado, sólo o junto a otras sustancias, y su efectividad. Aún más recientes son los trabajos de BOSUND (19) en los que al estudiar el efecto del benzoico y el salicílico sobre el proceso oxidativo de las células y la respiración endógena en algunas levaduras (concretamente *Saccharomyces cerevisiae*), a diferentes pH (hasta pH = 6) concluye que a igualdad de número de moléculas no disociadas el efecto es idéntico, independientemente del pH. Calcula que al más alto de los estudiados por él existe una molécula no disociada por cada 64, lo que representa el 1,6 % de la concentración disponible, lo que justifica la disminución de efectividad cuando éste crece. No hay duda que el pH puede tener otros efectos, así el mismo BOSUND (20) en un estudio sobre la retención de benzoico realizada por las especies *Proteus vulgaris* y por las que inte-

(17) R. H. GOSHORN, E. F. DEGERING y P. A. TETRAULT, *Ind. Eng. Chem.*, **30**, 646 (1938); O. RAHN y J. D. CONN, *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 185 (1944).

(18) M. VON SCHELHORN, *Deut. Lebensm. Rundschau*, **46**, 132 y 151 (1950).

(19) I. BOSUND, *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1231 (1960).

(20) I. BOSUND, *Physiol. Plantarum*, **13**, 793 (1960).



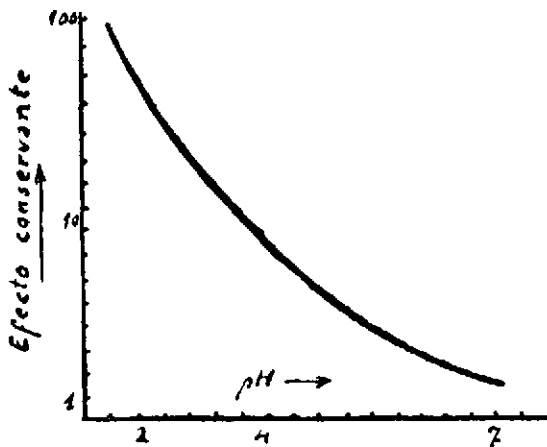
gran la levadura de pan, demuestra que la absorción relativa de inhibidor crece al bajar el pH; dicho de otra manera, el coeficiente de reparto

$$\frac{\text{Concentración de benzoico en la célula}}{\text{Concentración de benzoico en el medio}}$$

crece al disminuir el pH, por lo que el gráfico que representase esta variación es paralelo al de dependencia entre concentración de forma no disociada y pH.

A pH muy bajos llega a haber en el interior de la célula hasta 25 veces más benzoico que en el exterior; aún cabe admitir que como la célula no es homogénea y algunas estructuras del protoplasma muestran especial afinidad para el benzoico, en la superficie de tales estructuras habrá considerable acumulación del antiséptico y forzosa inhibición de los procesos localizados en ellas. En una serie de experimentos realizados por Oka (21), también con *Saccharomyces cerevisiae*, se muestra que el benzoico y otros inhibidores semejantes dentro de la célula pueden estar disueltos o adsorbidos sobre fases sólidas, siendo esta forma la realmente activa.

Recogemos de DESROSIER (22) un gráfico en el que se representa la dependencia entre pH y actividad conservante del benzoico, lo que en realidad depende tanto de los hechos considerados (moléculas no disociadas, capacidad de reparto, proporción adsorbida) como de la actividad auxiliar que por efecto propio pueda determinar el pH, y con sentido negativo influye también la tendencia a la reacción con materiales de efecto substractivo (por ejemplo, ciertas proteínas). He aquí el gráfico a que nos referimos:



(21) S. Oka, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 24, 59, 338, 412 y 516 (1960).

(22) N. W. DESROSIER, *The Technology of Food Preservation*. Ed. The Avi Publishing Company, Inc., Westport (1959); pág. 308.

DESROSIER (loc. cit.) comenta que la acción germicida del benzoico a pH = 3,0 es unas 10 veces superior a la ejercida a pH = 7 y unas 100 veces mayor que la mostrada a pH ligeramente alcalino.

No hay duda que de una manera u otra el ácido benzoico ejerce su acción sobre algunos de los diversos mecanismos enzimáticos que rigen el metabolismo celular, provocando disturbios sobre los mismos. Ha de destacarse que la acción no es necesariamente inhibitoria sino que en algunos casos es más bien estimulante, pero que siempre habrá un desequilibrio en el acople general de las reacciones. Veamos algunos efectos bastante catalogados, aunque todavía queda mucho por hacer.

Así, respecto al metabolismo de hidratos de carbono, siguiendo a BOSUND (19) puede destacarse que el benzoico (en esto se comporta como el salicílico) estimula la oxidación de glucosa hasta piruvato y no impide la oxidación directa a acetato, entorpeciendo el acoplamiento normal de utilización de los grupos piruvato y acetilo, especialmente estos últimos, como fuente de energía, a través del ciclo tricarboxílico, o por formación de aceto-acético u otros pasos biosintéticos; la interferencia fundamental se ejerce sobre la función de la *coenzima A* (CoA), al formarse benzoil-CoA en vez de la acetyl-CoA normal; esta última, por ejemplo, se copularía con otra de acetyl-CoA para producir acetilacético o con una de oxalacético para formar cítrico, cadena que queda interrumpida, según AVIGAN y otros (23), al benzoilarse la coenzima A.

En general, los procesos afectados serían aquellos en relación con ciertas estructuras de la célula mientras quedarían sin afectar aquellos procesos estimulados por enzimas solubles en el seno del protoplasma.

Hay una analogía entre la concentración máxima que inhibe la reproducción celular y la que bloquea la oxidación normal de acetato, para el caso de medios ricos en aminoácidos, en cambio, como BOSUND y otros (24) observaron, cuando el medio de cultivo es pobre en aminoácidos los gérmenes de prueba se destruyen a concentraciones de benzoico (y también de salicílico) bajas, que no tienen efecto en la oxidación de acetato.

Era ya conocido, según los experimentos de COLLETT y CLARKE (25) que el benzoico inhibe la oxidación del cítrico, succínico y málico en los tejidos musculares. Por otro lado KAPLAN y otros (26) han estudiado el efecto sobre varias enzimas del ciclo tricarboxílico. BOSUND (27), del que tomamos el esquema de dicho ciclo que acompañamos, al comentar uno de sus propios trabajos (28) destaca que la velocidad de oxidación de los

(23) J. AVIGAN, J. H. QUASTEL y P. G. SCHOLEFIELD, *Biochem. J.* **60**, 329 (1955).

(24) I. BOSUND, I. ERICHSEN y N. MOLIN, *Physiol. Plantarum*, **13**, 800 (1960).

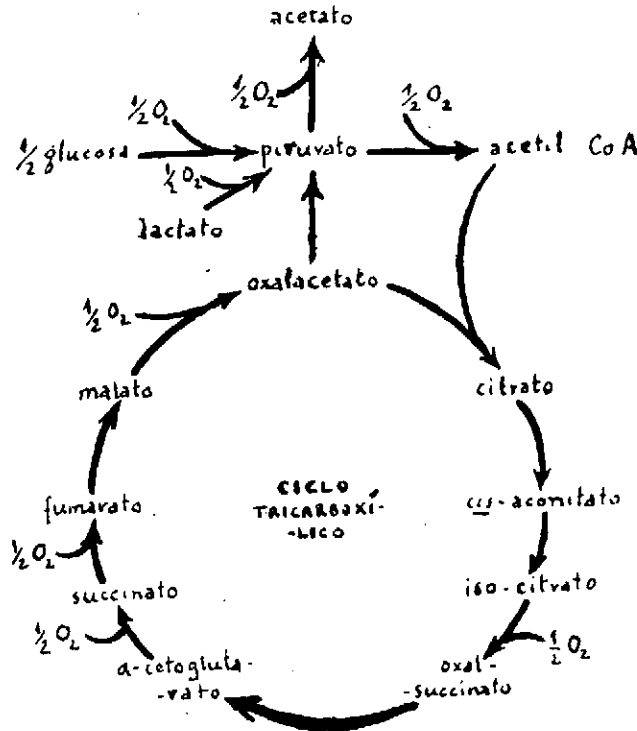
(25) M. E. COLLETT y M. F. CLARKE, *J. Biol. Chem.*, **82**, 429 (1929).

(26) E. H. KAPLAN, J. KENNEDY y J. DAVIS, *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 47 (1954).

(27) I. BOSUND, *Adv. in Food Research*, **11**, 331 (1962).

(28) I. BOSUND, *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1243 (1960).

diversos intermedios de este ciclo disminuyen por la acción de concentraciones algo mayores que las requeridas para la inhibición de la reproducción celular, deduciendo por tanto que la oxidación del acetato es la fase más sensible; se sobreentiende que se inhibe el proceso de activación que conduce a la formación de acetil-CoA, o incluso a la inmediata etapa



de condensación de esta acetil-coenzima con oxalacetato. Sin embargo, es de resaltar que el bloqueo afecta también a las restantes fases del ciclo, habiendo observado BOSUND que la oxidación de los diversos ácidos del mismo, a partir del α -cetoglutárico se inhibe prácticamente igual que la de este último, pese a que podría preverse que éste fuera el más sensible puesto que para oxidarse lo hace vía succinil-CoA, comparable al complejo acetil-CoA.

Aun cuando el benzoico, análogamente al salicílico, bloquea la oxidación en la etapa de acetato activado (*), estimula sin embargo el consumo de oxígeno por parte de la célula, lo que podría explicarse así. Al producirse un desacople que entorpece la formación de ATP (=Adenosin-

(*) Nos referimos a la forma acetil-CoA.

trifosfato) hay un incremento en el consumo de oxígeno para una idéntica cantidad de sustrato, a base de mayor número de degradaciones, como reacción de la célula microbiana para compensar el pobre consumo que determina la diferida formación oxidativa de ATP. En efecto, en experimentos de BOSUND (19), realizados sobre *Pseudomonas fluorescens*, se muestra que en presencia de benzoico estas bacterias metabolizan la glucosa *via* acetato, pasándola a CO₂ y H₂O. Hay hechos claros en los que está manifiesta la acción sobre la fosforilación oxidativa (proceso energético ligado al ATP), así en 1956, PENNIAL, KALNITSKY y ROUTH (29) demostraron, después de unos estudios sobre las mitocondrias de células animales, que el ácido salicílico inhibe la fosforilación oxidativa, resultados que también ha obtenido BOSUND (30) con el benzoico, pero éste es algo menos específico, requiriendo concentraciones altas en las condiciones de pH (concretamente trabajó a pH = 7) utilizadas. El que la interferencia afecte al ATP no es extraño puesto que la formación de éste debe estar ligada a estructuras de naturaleza lipoprotéica sobre las cuales es más lógico que actúen estos conservantes liposolubles. Por otro lado la metabolización de acetatos hasta carbónico y agua ha sido confirmada de manera inequívoca en el trabajo de BOSUND (31) realizado agregando al sustrato metil y carboxilacetatos marcados.

La toma de iones amonio es otro proceso asimilatorio fuertemente inhibido por el benzoico y por el salicílico, según observaron BERNHEIM y DE TUR (32) en sus trabajos con *Pseudomonas aeruginosa*; éstos sugieren que el efecto debe explicarse por una inhibición específica de la producción o utilización de los compuestos de elevada energía, lo que concuerda con las observaciones antes hechas. IVANOVICS (33) ya observó en sus experimentos que ciertos aminoácidos, especialmente valina, lisina, leucina y metionina, disminuyen la actividad del salicílico, mientras más recientemente BOSUND, ERICHSEN y MOLIN (24) demostraron que en el caso del benzoico son el glutámico, cisteína y metionina los más activos contra este inhibidor. En realidad, si la actividad del conservante no es del todo específica, la acción de los aminoácidos particulares podría, más bien, considerarse como debida a la naturaleza del germen empleado o a las propias condiciones experimentales.

De una manera concreta conviene destacar también como efecto del benzoico sobre enzimas el poder inhibidor selectivo frente a D-aminoácido-oxidasas, observado en experimentos «in vitro» por KLEIN y KA-

(29) R. PENNIAL, G. KALNITSKY y J. ROUTH, Arch. Biochem. Biophys., 64, 390 (1956).

(30) I. BOSUND, Acta Chem. Scand., 11, 541 (1957).

(31) I. BOSUND, Physiol. Plantarum, 13, 812 (1960).

(32) F. BERNHEIM y W. E. DE ZUREK, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 103, 107 (1951).

(33) G. IVANOVICS, Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's, 276, 33 (1942).

MIN (34), poder que ha de tener aún más hondo significado cuando se abarca a D- y L-aminoácido-oxidasas «in vivo», sobre todo si tales enzimas catalizan igualmente la reacción inversa de formación de aminoácidos a partir de cetoácidos y de iones amonio, lo que ha sido confirmado por los trabajos de RADHAKRISHAN y MEISTER (35). Es interesante resaltar que en lo que a esta acción se refiere el poder del benzoico es casi 5,3 veces superior al del salicílico y unas 42 veces más intenso que el del *para*-oxibenzoico, según se deduce del trabajo de BARTLETT (36) en el que se compara la actividad de varios derivados *para*- y *orto*-sustituídos del benzoico frente a D-aminoácido-oxidasas; de ellos el más parecido al benzoico es el *para*-clorobenzoico.

Por último, según trabajos de KUTTNER y WAGREICH (37) el poder inhibidor del benzoico frente al enzima catecolasa es también bastante específico, siendo unas 32 veces superior al mostrado por el salicílico y unas 41 veces mayor que el del *para*-oxibenzoico.

En definitiva, se ha visto que el benzoico interfiere por un lado con varios sistemas enzimáticos, en algunos como el de las aminoácido-oxidasas y catecolasas con gran especificidad, y por otro con el metabolismo energético (formación de ATP) aunque en éste no con tanta especificidad como el salicílico, al menos en los experimentos de laboratorio con mitocondrias. Pero no pueden desestimarse las acciones que por su elevada liposolubilidad debe ejercer por acumulación sobre la membrana celular o en otras estructuras de la célula microbiana. Quedan por tanto aún dudas sobre la forma auténtica de actuación de este conservante, pero se admite que es la suma de efectos parciales la que justifica su actividad práctica, que está bien reconocida.

En general todos estos estudios han sido hechos a temperaturas muy suaves, mientras que en la práctica se recurre en muchos casos de aplicación, la mayoría, a aprovechar la acción sinérgica del calor o la de otros conservantes, como sucede en los ejemplos concretos que comentamos en su momento.

Aspectos toxicológicos y legales

Queda ahora por considerar si los efectos del benzoico podrían perjudicar de alguna manera al hombre al ingerir las conservas que contienen.

(34) J. R. KLEIN y H. KAMIN, J. Biol. Chem., **138**, 507 (1941).

(35) A. N. RADHAKRISHNAN y A. MEISTER, J. Biol. Chem., **233**, 444 (1958).

(36) G. R. BARTLETT, J. Am. Chem. Soc., **70**, 1010 (1948).

(37) R. KUTTNER y H. WAGREICH, Arch. Biochem. Biophys., **43**, 80 (1953).

este aditivo (*). Con este fin se vuelve a recordar que es condición imprescindible para que merezca la pena el intentar comprobar la utilidad de un conservante el que éste no sea un producto nocivo para la salud, ni de manera inmediata ni por efecto acumulativo. En este sentido pueden destacarse los siguientes hechos en relación con el benzoico:

a) Es tradicionalmente utilizado el benzoico para la conservación de productos alimenticios y de muchos medicamentos sin recordarse incidencias por su efecto.

b) El Ministerio de Sanidad inglés que en 1923 consideró el uso de antisépticos y materias colorantes para alimentos «como práctica indesca-ble» ordenó los conservantes entonces usuales en tres grupos:

- b₁) formaldehído y sus derivados y fluoruros
- b₂) ácidos bórico y salicílico y sus sales de sodio
- b₃) ácido benzoico y sulfuroso y sus sales de sodio

destacando que sólo podrían ser permitidos los del tercer grupo (en el que va el benzoico) aunque dentro de ciertos límites.

c) Las reuniones de expertos para el control de productos alimenticios de la Europa Occidental (representantes de Inglaterra, Francia, Alemania, Italia y países del Benelux) en junio de 1956 en La Haya y en enero de 1957 en Bonn, hicieron cuatro grupos de conservantes:

- c₁) Sin peligro para la salud (cloruro sódico, azúcar, alcohol, vinagre, ácidos acético, láctico, propiónico, carbónico, tartárico, cítrico, sórbico y las sales sódicas de ellos, glicerina,...).
- c₂) Sin peligro para la salud si se usan dentro de ciertos límites (ácido benzoico y benzoato sódico, anhídrido sulfuroso y sulfito sódico).
- c₃) Sustancias peligrosas para la salud (ácidos bórico, ácidos monocloro y monobromo acético, *para*-oxibenzoico y sus ésteres, cloropirina, ácido dehidroacético, las sales de los diversos ácidos citados, la 8-oxiquinoleína, tiourea,...).
- c₄) Sustancias cuyo peligro o inocuidad para la salud no han sido comprobados con seguridad (antibióticos, ácidos crotónico y fórmico y sus sales, difenilo, salicílico y su sal sódica, morfina,...)

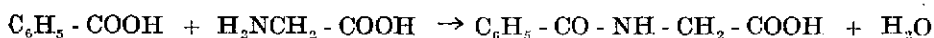
estimando que sólo los de los dos primeros grupos debían ser tenidos en consideración para las disposiciones transitorias.

d) En Estados Unidos, país de legislación sobre alimentos tradicio-

(*) El benzoico es constituyente natural en el arándano agrio, ciruelas, canela y clavo; en la goma llamada benzoina; en los bálsamos de Perú y Tolu.

nalmente rigurosa, hay una orden de la Food and Drug Administration, de 3 de marzo de 1909 autorizando el benzoato sódico que fue el único conservante hasta 1953 (38).

Como se trata de hacer una exposición objetiva no puede omitirse como comentario adicional que si este conservante se usara en cantidades muy grandes, como ocurre con la mayoría de los productos orgánicos, podría llegar a ser tóxico o a perjudicar la flora intestinal, pero utilizado en cualquiera de las cantidades concretas que suelen autorizar las diversas legislaciones tiene la ventaja de que se hace relativamente fácil su eliminación por la orina, al copularse con glicocola y constituir ácido hipúrico (*).



El conjunto de hechos favorables y el probado poder conservante del benzoico justifica el porqué las legislaciones sobre alimentos de casi todos los países establecen puntos de vista concretos en relación con su empleo. Muy de pasada haremos una revisión (*) sobre la postura de algunos de los países más característicos; para la exposición se han ordenado alfabéticamente

Alemania (39) especifica los productos en que puede admitirse el benzoico y las tolerancias en cantidad. Y por lo que afecta a conservas pueden destacarse unos cuantos ejemplos. Así, autoriza 0,15 % para escabeches y otros derivados de pescados y moluscos, en salsa; el 0,25 % para pescados en aceite o para productos a base de hueva (caviar, por ejemplo); el 0,4 % para derivados de anchoas poco saladas y para preparados de mariscos no esterilizados; el 1 % para yemas y huevos completos batidos o desintegrados (licuados); el 0,25 % para mayonesas; un 0,1 % para zumos y combinados de ellos destinados a bebidas refrescantes; un

(38) A. SOLER, «Posibilidades del ácido sórbico en la industria conservera». Publicaciones del Centro de Investigación de Frutos y Conservas, Murcia (1959).

(*) De la misma manera que el benzoico se elimina como hipúrico, el fenil acético se elimina como fenil acetúrico $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, también por copulación con glicocola KNOOP [véase L. F. FIESER y M. FIESER (trad. F. GIRAL), Ed. Grijalvo, S. A., México, D. F. (1960), pág. 600] generaliza el hecho a todos los compuestos de fórmula general $\text{C}_6\text{H}_5 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ dando hipúrico o fenil acetúrico según que n sea un número par o impar respectivamente.

(*) La Asociación de Investigación de Conservas Vegetales, para la que trabajan el Departamento de Química Vegetal de Valencia y el Centro de Investigación de Frutos y Conservas de Murcia, ambos del Patronato «Juan de la Cierva», ha enviado a sus miembros una circular titulada «Legislación (n.º 1): Benzoico y Benzoatos», Depto. de Q. Vegetal, Valencia, octubre, 1963, que constituye una excelente revisión, pero de difusión restringida.

(39) La ley general de productos alimenticios es de 21 de diciembre de 1958, modifica la de 17 de enero de 1956 y ordenanza de 14 de agosto de 1943; regula el empleo de aditivos y en el reglamento de dicha ley de 19 de diciembre de 1959 se especifica lo relativo al uso del ácido benzoico.

0,15 % para algunas compotas en envases no herméticos; un 0,15 % para ensaladas de verduras; 0,20 % para conservas de pepinillos y otros variantes al aceite en los que la conservación no se deba a fermentación láctica; 0,15 % para mazapanes y productos similares obtenidos de semillas oleosas distintas de la almendra y para ciertos turroneos de frutas; 0,25 % para cebollas y rábanos rallados; 0,15 % para pieles de cítricos ralladas. Requiere la legislación alemana que se haga constar en la etiqueta de los elaborados el hecho de contener antiséptico, indicándose el nombre correspondiente o el número que en la última codificación se adoptó (*) (**).

En Canadá (40) se admite igualmente el 0,1 % de benzoico, especificándose su uso para los siguientes elaborados: pulpas, pasta, puré y cap-sup de tomate; encurtidos; zumos de frutas; mermeladas diversas (sin y con pectina añadida); jaleas de frutas con pectina añadida; rellenos para pasteles; picadillos de carne y varios elaborados de pescado. Existe la obligación de declarar la adición, indicándolo en la etiqueta.

En Dinamarca (41) las únicas normas específicas de utilización han sido dadas por el Servicio de Sanidad para el caso de los zumos de frutas (los que hayan de diluirse más de cuatro veces para su consumo podrán contener hasta 2.000 mg/l.; los que se consuman sin diluir pueden llevar hasta 400 mg/l.); compotas y mermeladas de frutas (1.500 mg/Kg.) y derivados de huevos (líquidos, congelados o deshidratados) para los que admiten 8.000 mg/Kg.

Está, en cambio, expresamente prohibido en los siguientes productos: leche, nata, leches condensadas y deshidratadas, mantecados helados y sorbetes; mezclas y polvos para su preparación, quesos fundidos, manteca y margarina, aceites y grasas comestibles y vinagre.

En Egipto un decreto del año 1953 admite la adición de 2.000 p.p.m. (0,2%) al zumo de uva no fermentado; 1.000 p.p.m. a bebidas alcohólicas a base de frutas, estimulantes y zumos de frutas azucaradas o no;

(*) La orden de 19-XII-1959. [Véase: «Lebensmittelrecht», Ed. C. H. Beck, Munich-Berlin (1961), pág. 31] asigna al benzoico y benzoato el n.º 2.

(**) Una interesante revisión sobre la legislación anterior a 1-VI-1959 es: A. KLOESSEL, H. SPERLICH y K. G. BRÄGNER, «Deutsches Lebensmittelrecht», Ed. Kohlhammer, Stuttgart (1959); se refiere a benzoico en págs. 103, 501 y 566.

(40) Food & Drugs Act & Regulations.

(41) La ley de alimentos de 28 de abril de 1950 prevé que el Ministerio del Interior regu-lará lo referente a cada aditivo particular; este Ministerio no ha hecho uso de esa facultad y por eso las disposiciones en vigor son del Servicio de Sanidad (Orden de 19 de febrero de 1960). Una Orden anterior (12 de julio de 1958) obliga a la declaración en las etiquetas, de los aditivos utilizados.

120 p.p.m. a las aguas minerales azucaradas y al licor de gengibre y 250 p.p.m. a las legumbres azucaradas y a las salsas a base de frutas y legumbres. Existe obligatoriedad de declararlo en la etiqueta (Art. 3.º del Decreto) para su utilización en el país y mediante una marca especial, señalada por el Ministerio de Comercio, para el caso de éste u otros aditivos, si la calidad o cantidad en que se usen están autorizados por los países de destino (Art. 8.º del citado Decreto).

En España existe una orden transitoria del Ministerio de la Gobernación de 8 de octubre de 1945 que autoriza el empleo de benzoico en la proporción de 1 por mil, siempre que se solicite permiso, para su empleo, de la Dirección General de Sanidad (Sección de Industrias de la Alimentación) y se haga la declaración en la etiqueta. En cambio salió una orden quizá un poco drástica del Ministerio de Comercio que no prevé su utilización para la exportación incluso para productos que han de reenvasarse en países de destino, aún en el supuesto que en los mismos, como ocurre en algunos casos, esté autorizado éste u otros aditivos; la referida orden del Ministerio de Comercio es de 16 de mayo de 1961, se circunscribe a conservas de albaricoque, melocotón, frutas en almíbar, tomate, pimiento y espárragos como productos más característicos españoles, autorizando sólo el sulfuroso, lo que como es natural sólo podría afectar al caso de productos embarrilados. A nuestro criterio, hubiera sido prudente que en la citada disposición existiera una cláusula admitiendo «aquellos conservantes que fueran permitidos en los países de destino siempre que se cumplieran las formalidades exigidas por tales países».

En cambio la orden del Ministerio de Comercio de 31 de julio de 1962, en sus normas para la exportación de derivados de agríos, autoriza hasta un 2 por mil de benzoico para la conservación de zumos naturales y de jarabes. Para bebidas a base de zumos cítricos autoriza el 0,2 por mil y nada para los congelados.

Por otro lado la Presidencia de Gobierno por Orden de 5 de marzo de 1963 (B. O. de 13 de marzo) aprueba nuevas reglamentaciones para zumos de frutas, concentrados, edulcorados y néctares; otra para bebidas refrescantes y una tercera para jarabes y horchatas. Se admite el 1 por mil de benzoato sódico para zumos destinados a consumo directo y el 2 por mil para preparados industriales (zumos, concentrados y edulcorados), prohibiéndolo para néctares. La reglamentación para bebidas refrescantes hace cuatro grupos: a) aguas gaseadas, b) gaseosas o sodas, c) de extractos (cola, agua tónica, frutas disgregadas, etc.), d) zumos de frutas. Permite la reglamentación 120 mg/l para las de los grupos b) y c) y

600 mg/l para las del c), no admitiendo nada, por innecesario, para las del grupo a). En la reglamentación de jarabes y horchatas se admite 0,6 por mil para los jarabes de esencias, 1 por mil para los de zumos de frutas y hasta un 2 por mil para las horchatas.

Estados Unidos (42) califica al benzoato sódico, con una tolerancia hasta 0,1 %, como una de «las sustancias que se reconocen como seguras para su pretendido uso dentro del significado de la sección 409 de la Ley de Alimentos y Drogas (de la Food & Drug Administration)». No obstante el uso de cualquier aditivo requiere en aquel país la declaración expresa de la Ley para cada producto, así puede destacarse (43) que para mermeladas, jaleas y cremas de frutas, así como para margarina y oleomargarina se permite la utilización del 1 por mil de benzoato sódico o de benzoico con la condición de que se indique en la correspondiente etiqueta «...added as a preservative».

En Francia existía una Ley general (44) que prohibía los aditivos para la conservación de alimentos, admitiendo por tanto sólo métodos físicos de conservación. Más recientemente han ido saliendo disposiciones particulares permitiendo el anhídrido sulfuroso para algunos productos. El benzoato sódico se ha admitido por Orden de 26 de julio de 1956 sólo para el caso concreto del caviar.

En Gran Bretaña en su legislación de 4 de agosto de 1925 permitía el ácido benzoico para los siguientes productos relacionados con conservas: zumos de uvas no fermentados o vinos no alcohólicos procedentes de éstas (2.000 p.p.m.), otros vinos no alcohólicos y zumos de frutas, edulcorados o no (600 p.p.m.), aguas minerales edulcoradas (120 p.p.m.), licor de gengibre (120 p.p.m.), extracto de café (450 p.p.m.), encurtidos y frutas o verduras en salmuera (250 p.p.m.). Existe obligación de declarar en la etiqueta la adición del conservante cuando a los vinos y zumos se les haya agregado más de 600 p.p.m. o cuando haya sido empleado para el extracto de café y encurtidos y salmueras, aunque se utilice en la proporción establecida como límite.

Grecia promulgó su legislación general sobre aditivos en 1924, existiendo una serie de aclaraciones más recientes. Así, la circular 113 de 1940 autoriza un 1 por mil de benzoato sódico para limonadas conteniendo

(42) Enmienda a la Ley de Alimentos y Drogas de la Food & Drug Administration, que entró en vigor el 6 de marzo de 1960.

(43) Code of Federal Regulations, Part. 121, Chapter I, title 2, Subpart..

(44) Decreto de 15 de abril de 1912 y resolución de 28 de junio de 1912.

do jarabe de pasas o glucosa. La número 165 de 1940 admite para conservas de verduras en formatos de más de 1 Kg., hasta 1,5 grs./Kg. La Orden de 1940, n.º 166, prevé el uso de 1,5 grs./Kg. para mermeladas o compotas y el 1 por mil para mermeladas de higos. Posteriores son la Orden 108 de 1956 que autoriza 1 por mil de benzoico o benzoato sódico para limonadas efervescentes y la disposición 1.040 de 1956 que establece como límite para mostos 1 gr/Kg. Debe constar en las etiquetas

Holanda limita el empleo a los siguientes productos: zumos de frutas (250 mg/Kg) (45 a), materias primas a base de huevo (2.500 mg/Kg) (45 b), salsa picante (250 mg/Kg) (45 c), margarina (2.500 mg/Kg) (45 d), vinos de frutas (300 mg/Kg) (45 e), semiconservas de pescado (45 f). En todos los casos debe de declararse en las etiquetas.

Irlanda, a lo largo de una serie de disposiciones (46) admite el uso de benzoico o benzoato en los mismos productos que Gran Bretaña, sólo que no hacen referencia al extracto de café, y también con los mismos límites. Se declarará en la etiqueta.

Italia en su última disposición, a la que ya hemos hecho alusión en otro lugar (46) regula el empleo de aditivos en general y de benzoico y benzoatos en particular. Se autoriza expresamente 1.500 mg/Kg. para semiconservas de pescado y para caviar y sucedáneos; provisionalmente (hasta 8 de agosto de 1963) autoriza 500 mg/l para bebidas no alcohólicas, gaseadas o no. Debe declararse en la etiqueta (*).

Noruega (47) admite el benzoico en los siguientes productos y con los siguientes límites: quesos (0,3 %), semiconservas de pescado y salazones (0,5 %), conservas de legumbres, frutas y bayas (0,15 %), grasas, aceites, mayonesas y productos a base de mayonesa (0,3 %) y bebidas refrescantes carbonadas (0,05 %). El benzoico puede ser sustituido por la mis-

(45) a) Orden de 2-11-39; b) 30-8-40; c) 8-11-47; d) 10-9-46; e) 27-7-54; f) 10-11-54.

(46) Eireann Statutory Rules and Orders, 1958, n.º 64, the Public Health (Preservatives, etc. in food Regulations 1928. Statutory Rules and Orders 1943 Nr. 74 Public Health (Preservatives, etc. in food) (Amendment) Regulations (1943).

(*) Interesantes revisiones de la legislación italiana sobre alimentación antes de la disposición de 19 de enero de 1963 a la que se refiere en (6), son: G. RABAGLIETTI: «Codice della legislazione sugli alimenti bevande sostanze e prodotti agrari», Ed. S.P.E.L., Bologna (1957); G. RABAGLIETTI: «Complemento al Codice della legislazione sugli alimenti bevande sostanze e prodotti agrari», Ed. S.P.E.L., Bologna (1959); G. RABAGLIETTI: «Nuova legislazione sulla Disciplina Igienica della Produzione e della Vendita delle Sostanze Alimentari e delle Bevande» (incluye la legislación y jurisprudencia relativa a alimentos, bebidas, sustancias y productos agrícolas, entre 30-6-1959 y 30-6-1962, constituyendo el segundo complemento al «Codice della legislazione...» primeramente señalado. Ed. S.P.E.L., Bologna (1962).

(47) Real Decreto de 3 de mayo de 1955.

ma proporción de benzoato sódico; uno u otro deberá declararse en la etiqueta.

Portugal tiene regulado el empleo de benzoico o benzoato sódico en los siguientes productos, para los que dá los siguientes límites: semiconservas de pescado (0,5 %), zumos de frutas destinados a preparar bebidas no alcohólicas (0,15 %), pulpas de frutas y preparados de éstas para comotas y similares (0,2 %), conservas de verduras (sin vinagre) (0,2 %) y conservas en vinagre (1,5%). Hay obligación de declararlos en la etiqueta

Suecia (48) sólo permitía últimamente el empleo de benzoico o benzoato en semiconservas de pescado (0,2 %) y en mostos (0,15 %) debiendo declararse en la etiqueta.

Suiza (49) admite benzoico o benzoato sódico en los siguientes casos y con los límites que se indican: conservas en vinagre (pepinillos, cebollas, zanahorias,...) (1,5 gr/l), jugos de frutas, salvo el de uva y frutas de pepita (1 gr/Kg), jarabes de frutas (0,4 gr/Kg), confituras de frutas (1,0 gr/Kg), mermeladas, jaleas, concentrados y otros productos que por su consistencia se utilizan extendidos sobre el pan (1 gr/Kg). Como en todos los países se requiere hacer declaración en la etiqueta.

Turquía según nuestra información se rige por la Ley de 24 de abril de 1930 y admite el benzoico en los siguientes productos: embutidos, conservas de carne y ahumados (0,125 gr/100 gr), margarina (0,2 gr/100 gr), mayonesa (0,25 gr/100 gr), zumos de frutas (0,15 gr/100 gr) y puré de tomate (0,20 gr/100 gr), obligando a declarar en la etiqueta su empleo.

Como se deduce de lo que acabamos de exponer en relación con cada país hay gran heterogenidad en los puntos de vista lo que indudablemente complica las transacciones internacionales en unos tiempos en que éstas deben simplificarse en sus trámites, máxime ante la formación de comunidades conómicas con tendencia a la desaparición de cotos aduaneros.

Por un lado la F.A.O. intenta la creación de un Código de Alimentación de carácter internacional en el que se aúnen de manera definitiva las voluntades de los diversos Gobiernos que en sus Códigos Alimenticios particulares han ido estableciendo los jalones necesarios para este otro plan más ambicioso.

Por otro lado el Parlamento Europeo el 28 de junio de 1963 (Gaceta

(48) Decreto de 19 de noviembre de 1956.

(49) Ordonnance réglant le commerce des denrées alimentaires et de divers objets usuels de 26 de mayo de 1936.

Oficial de la Comunidad Europea, de 12 de julio de 1963) aprobó una resolución por la que se pretende hacer una lista única de conservadores de productos alimenticios que deben ser permitidos en la cual figuran el benzoico y sus sales sódicas, potásica y cálcica. Han de salir otras regulaciones en las que se especifiquen los productos concretos a los que puedan adicionarse estos conservantes así como los límites convenientes.

Comentario final

Creemos que a lo largo de todo este trabajo se ha tratado de exponer de forma objetiva la situación actual del ácido benzoico y benzoatos como conservantes a la luz de la información bibliográfica y de la que nosotros hemos adquirido en nuestro constante contacto con la Industria, felizmente complementada en un plan de experiencias realizadas en nuestros laboratorios de Microbiología y en los de Tecnología con resultados muy explícitos. Destacamos la efectividad del conservante aquí estudiado siempre que su uso se haga correctamente, sobre todo en lo que respecta a distribución en el seno del producto a conservar y en las condiciones de pH que en él reinan por naturaleza o por corrección hasta el límite conveniente mediante la incorporación de otros ácidos.

Murcia, 25 de febrero de 1964.

*Centro de Investigación de Frutos y Conservas,
Universidad de Murcia y Patronato "Juan de la Cierva"*