

## Tesis de Posgrado

# Destrucción de vitamina C en sistemas modelo de actividad acuosa reducida

Rojas, Ana María Luisa

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rojas, Ana María Luisa. (1995). Destrucción de vitamina C en sistemas modelo de actividad acuosa reducida. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2771\\_Rojas.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2771_Rojas.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rojas, Ana María Luisa. "Destrucción de vitamina C en sistemas modelo de actividad acuosa reducida". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2771\\_Rojas.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2771_Rojas.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

**Destrucción de vitamina C en  
sistemas modelo de actividad acuosa  
reducida**

Ana María Luisa Rojas

Tesis presentada para optar al  
Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Directora de tesis: *Dra. Lía Noemí Gerschenson*

1995

#2771

y 2  
pte 1



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires, a la Secretaría de Ciencia y Tecnología (Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo financiero brindado para la realización de esta tesis.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por facilitar el uso de sus instalaciones.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, quien dirigió este trabajo, por la dedicación, el estímulo y la ayuda que siempre recibí, así como por su infinita paciencia.

A las Dras. Pilar Buera y Carmen Campos quienes, en forma desinteresada me asesoraron para el tratamiento de algunos temas de este trabajo, así como por el afecto de ellas recibido.

A la Comisión Nacional de Energía Atómica (Proyecto de Agua Pesada) y muy particularmente al Lic. Pablo Bruzzoni, al Dr. C.H. Portal y al Ing. Okendo, por haber facilitado el gas sulfuro de hidrógeno utilizado en este trabajo.

A la Cátedra de Química Analítica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y muy en especial a la Bqca. Claudia Rimoli, de la que recibí apoyo en el tratamiento de algunos temas de este trabajo, así como también por el afecto recibido durante el tiempo en que me desempeñé como docente.

A las Dras. Liliana Mauri, Mariela Carnino y al Sr. Juan Muess, por su asesoramiento en el manejo del cromatógrafo, necesario para corroborar algunos resultados.

A la Srta. Leticia Scoccia, por su dedicación en la edición de este trabajo.

Al Sr. Cabrera, Jefe del Taller del Departamento de Industrias, por su dedicación en el desarrollo y construcción de equipos necesarios para la realización de esta tesis.

A Ada Albertoni quien colaboró en las búsquedas bibliográficas realizadas.

Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Dto. de Mecánica, por haber colaborado desinteresadamente en la fabricación de elementos que fueran utilizados en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento de Industrias sin excepción, y particularmente a Susana Vidales y a Sandra Guerrero, quienes me ayudaron y acompañaron durante todo este tiempo.

A Merck Química Argentina, que proveyó parte de los reactivos utilizados en esta tesis.

Ana María Luisa Rojas

*A mis padres Claudio y Beatriz  
A mi hermano Jorge*

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS**

**Destrucción de vitamina C en  
sistemas modelo de actividad acuosa  
reducida**

**Ana María Luisa Rojas**

**Tesis presentada para optar al  
Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**Directora de tesis: *Dra. Lía Noemí Gerschenson***

**1995**

52  
f. 11 b

## INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Vitaminas y coenzimas	6
1.1.1. Vitamina C.	8
1.1.1.a. Generalidades.	8
1.1.1.b. Propiedades químicas.	9
1.1.1.c. Propiedades ácido-base.	20
1.1.1.d. Propiedades espectroscópicas.	22
1.1.1.e. Biosíntesis del ácido L-(+)-ascórbico.	25
1.1.1.f. Metabolismo del ácido L-(+)-ascórbico en humanos.	26
1.1.1.g. Requerimientos.	30
1.1.1.h. Funciones del ácido L-(+)-ascórbico en el organismo.	33
1.1.1.i. Acido ascórbico en alimentos.	46
1.1.1.j. Degradación química del ácido L-(+)-ascórbico	54
1.1.1.k. Destrucción enzimática de la vitamina C	62
1.1.1.l. Pardeamiento no enzimático	62
Acción del bisulfito de sodio	73
Inhibición del pardeamiento no enzimático por bisulfito	79
Inhibición por bisulfito del pardeamiento no enzimático debido al ácido L-(+)-ascórbico.	84
1.1.1.m. Cinética de destrucción química de la vitamina C	86
Efecto de la temperatura	91
Influencia del pH	93
Influencia del oxígeno	98
Efecto de los metales	103
Influencia de la actividad de agua	107
Influencia de la concentración y tipo de azúcares	110
Influencia de la presencia de aminoácidos	113
Influencia de los ácidos y de la composición de los buffers usados para ajustar el pH	117
Influencia de la luz y de las enzimas	118
Material de envasado del alimento	119
1.1.1.n. Métodos de determinación de vitamina C	120
Reacción ácido-base	122
Propiedades redox	122
Absorción en el espectro ultravioleta	127
2. OBJETIVOS	132
3. MATERIALES Y METODOS	133
3.1. Generalidades	133
3.2. Preparación de los sistemas modelo	135
3.3. Metodología de trabajo	137
3.3.1. Concentración de ácido L-(+)-ascórbico	138
3.3.2. Concentración de vitamina C	144

3.3.3. pH de la muestra . . . . .	144
3.3.4. Concentración de oxígeno disuelto . . . . .	145
3.3.5. Determinación de la absorbancia de la muestra a 420 nm de longitud de onda . . . . .	150
3.3.6. Actividad de agua . . . . .	150
3.4. Ensayo de pardeamiento no enzimático a 80°C . . . . .	151
3.5. Tratamiento estadístico de los resultados . . . . .	152
3.6. Reactivos utilizados . . . . .	153
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .</b>	<b>154</b>
4.1. Efecto del pH . . . . .	165
4.1.1. Acido ascórbico . . . . .	165
4.1.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	176
4.2. Efecto del acidificante . . . . .	179
4.2.1. Acido ascórbico . . . . .	179
4.2.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	184
4.3. Efecto de la presencia de estaño (II) . . . . .	189
4.3.1. Acido ascórbico . . . . .	189
4.3.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	192
4.4. Efecto de los humectantes . . . . .	197
4.4.1. Acido ascórbico . . . . .	197
4.4.1.1. Compensación entálpico-entrópica . . . . .	209
4.4.1.2. Estructura del agua . . . . .	218
4.4.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	232
4.5. Efecto de los antimicrobianos . . . . .	248
4.5.1. Acido ascórbico . . . . .	248
4.5.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	251
4.6. Efecto del agregado de bisulfito de sodio . . . . .	254
4.6.1. Acido ascórbico . . . . .	254
4.6.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	261
4.7. Efecto de la presencia de L-lisina . . . . .	269
4.7.1. Acido ascórbico . . . . .	269
4.7.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	277
4.8. Efecto de la presencia de la cámara de aire en el envasado . . . . .	282
4.8.1. Acido ascórbico . . . . .	282
4.8.2. Acido ascórbico total (vitamina C) . . . . .	292
<b>5. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>300</b>
<b>6. APENDICES . . . . .</b>	<b>307</b>
Apendice 1. Tratamiento estadístico de los datos . . . . .	307
Apendice 2. Mecanismo y velocidad de reacción . . . . .	346
<b>7. BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>359</b>
<b>8. TABLAS DE DATOS . . . . .</b>	<b>381</b>

**PARTE I**



## 1 - INTRODUCCION

El mantenimiento de un alto nivel de salud nutricional requiere de la disponibilidad continua de alimentos sanos y nutritivos que puedan proveer todos los elementos esenciales en cantidad suficiente como para conciliar las necesidades humanas.

Actualmente está muy desarrollado por las amas de casa, el uso de alimentos preservados. Ello torna importante la investigación sobre la seguridad y calidad de dichos productos, para obtener la máxima información acerca de la influencia de la tecnología de procesamiento y del posterior almacenamiento en su calidad nutricional, microbiológica y organoléptica.

Debe destacarse que ningún alimento puede preservarse y almacenarse sin algún sacrificio en su contenido nutricional, pero pueden optimizarse las condiciones de dichas etapas de modo tal de minimizar las pérdidas correspondientes.

Durante el almacenamiento de alimentos preservados pueden ocurrir muchos cambios que produzcan el deterioro de los mismos. Puede así haber destrucción de nutrientes, desarrollo de olores y colores indeseables, cambios de textura y/o desarrollo microbiano. La cinética de la reacción responsable del deterioro de la calidad depende de las características del producto, condiciones de almacenamiento y protección provista por el envase.

Entre los nutrientes que se pueden destruir se encuentra la **vitamina C**, de la cual son fuente importante las frutas cítricas, vegetales de hoja, papas, tomates, ajíes y kiwis, entre otros. El contenido de ácido L-(+)-ascórbico (AAs) y de ácido deshidroascórbico (DHA) de un alimento es lo que se conoce como su actividad de **vitamina C**. La forma oxidada del ácido L-(+)-ascórbico, o ácido deshidroascórbico tiene entre

el 75% y 80% de la actividad biológica del primero, pues es rápidamente reducido a AAs en el organismo animal (Cheftel y Cheftel, 1976).

La naturaleza lábil del ácido deshidroascórbico (DHA) sugiere que una vez que el AAs de los alimentos se ha oxidado a este compuesto, el valor del producto como fuente de vitamina C se ha afectado. A menos que esto se tenga en cuenta, la medición conjunta de AAs y DHA puede llevar a conclusiones erróneas si el alimento no va a ser consumido inmediatamente (Smoot y col., 1980).

La degradación del AAs y el pardeamiento que origina se puede producir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Cheftel y Cheftel, 1976) y por lo tanto, el producto que lo contenga sufrirá con relativa facilidad una disminución en su valor nutritivo durante el procesamiento y almacenamiento y, simultáneamente, una alteración de sus características organolépticas como resultado del pardeamiento. Es por esto que la evaluación del contenido de vitamina C constituye un indicador de la calidad del alimento preservado y almacenado, siempre que éste constituya una fuente importante de la vitamina. Los jugos de frutas cítricas en especial y de frutilla, tomate, kiwi y ananá, así como también jugos de frutas enriquecidos adrede, constituyen una fuente excelente de vitamina C para la población, dado el auge en el consumo de este tipo de alimentos. La retención de la actividad vitamínica durante las operaciones de extracción, tratamiento térmico y envasado, así como durante el posterior almacenamiento, es de primordial importancia en el valor nutricional y calidad organoléptica del producto obtenido, máxime después de haberse comprobado la mejor utilización por el organismo de la vitamina C natural respecto de aquella provista artificialmente (bajo diversas formas farmacéuticas) (Vinson y Bose, 1983).

Actualmente toma especial interés el consumo de esta vitamina como un factor de antienvjecimiento, dada su participación como amortiguador de reacciones mediadas por radicales libres en el organismo.

Numerosos investigadores han estudiado la destrucción del AAs durante el almacenamiento de sistemas modelo y alimentos, pero en condiciones muy diferentes a las de los alimentos reales. Así, algunos autores (Kahn y Martell, 1967) trabajando con soluciones modelo a través de las cuales se burbujeaban mezclas gaseosas, observaron que la velocidad de destrucción del AAs es proporcional a la concentración inicial de  $O_2$  disuelto. Otros (Eison-Perchonok, 1982) estudiaron la cinética de autooxidación de un sistema modelo tamponado a un pH de 6,1 burbujeando mezclas de  $O_2$  y  $N_2$  a través de la solución, observando una dependencia de dicha cinética con la concentración de  $O_2$  disuelto y una cinética de la autooxidación de la vitamina de orden uno con respecto al AAs y también respecto al oxígeno.

Es de destacar que en estos trabajos previos y otros (Joslyn, 1949; Miller, 1949.a, 1949.b; Singh, 1976) se estudió la destrucción del AAs en condiciones donde la presencia de oxígeno es considerablemente forzada por métodos de burbujeo, ya sea de aire o del propio gas y trabajando a elevados flujos, condiciones que distan de las que ocurren realmente en una planta industrial de elaboración de jugos de fruta o de productos semejantes o durante el almacenamiento. En muchos casos no se da a conocer tampoco la concentración real del oxígeno disuelto y, por ende, tampoco su directa contribución (en términos cinéticos) a la degradación del AAs. En el mejor de los casos se procede a calcular la solubilidad a partir de datos tabulados para agua que, en general, no se corresponden con los correspondientes a las concentraciones de solutos específicamente presentes (Kirk y col., 1977; Mohr, 1980; Miller, 1949.b; Eison-Perchonok y Downes, 1982). Estos estudios son muy valiosos para el conocimiento del comportamiento químico de la vitamina, pero sus conclusiones no pueden ser extrapoladas, en muchos casos, a otras condiciones.

Evidentemente, el estudio de la destrucción del AAs en aquellos alimentos que son fuente importante del mismo, tiene mucha trascendencia y debe realizarse en condiciones

semejantes a las reales. Lee y col. (1977) estudiaron la destrucción del AAs durante el almacenamiento de jugo de tomate esterilizado comercialmente y envasado en latas, como función del pH, del contenido de cobre y de la temperatura de almacenamiento. La reacción de destrucción con el tiempo presentó una cinética de primer orden para condiciones de anaerobiosis, según los autores, ya que el jugo había sido desaereado. La constante de degradación variaba con el pH, presentando un máximo cerca del  $pK_{a_1}$  del AAs ( $pK_{a_1} = -\log K_{a_1}$ ;  $K_{a_1}$  es la primera constante de disociación ácida en agua pura).

Pino y col. (1981) estudiaron la destrucción del AAs durante el almacenamiento del jugo concentrado de naranja, esterilizado comercialmente y envasado en frascos color ámbar, observando una cinética de destrucción de primer orden.

Salvo pocas excepciones (Dennison y col., 1978) en las cuales se enfatizó particularmente la importancia de la necesidad de determinar durante la destrucción del AAs, la concentración de éste y de su primer producto de degradación oxidativa, el DHA, no se hace hincapié en la determinación de este último ni se lo considera, dando por sentado su baja concentración sin haberla medido o asegurando que su existencia natural, aún en vegetales, es en realidad un artefacto de la extracción del AAs, dada su natural inestabilidad en presencia de oxígeno.

En la generalidad de los trabajos existentes sobre sistemas modelo se estudia la influencia del pH, de los diferentes azúcares, de los distintos aminoácidos y de otros ácidos orgánicos sobre la estabilidad del AAs (Curl, 1949; Joslyn, 1956), porque en ellos se da importancia a la implicancia que tiene la **composición** del sistema en sí mismo. Existen muchos trabajos en los que se estudia la destrucción del AAs en relación al contenido de agua "disponible" del sistema, es decir, en relación a la actividad de agua ( $a_w$ ). Esto se efectuó tanto en sistemas modelo como en sistemas reales, pero en todos ellos se trabajó con materiales

deshidratados ( $a_w$  entre 0,11 y 0,50) y con aquellos llamados de humedad intermedia ( $a_w$  entre 0,65 y 0,85) (Riemer y Karel, 1978). Muchos investigadores ya han establecido que la velocidad de destrucción del AAs aumenta conforme lo hace la actividad de agua, alcanzando máxima velocidad para  $a_w \geq 0,8$  (Riemer y Karel, 1978) (Lee y Labuza, 1975). Esto es lógico dado que a altas actividades de agua, el contenido de agua disponible para actuar como solvente, es elevado.

La velocidad de pardeamiento del producto debida a la destrucción del AAs está también determinada por la actividad de agua del sistema. Así se sabe que en cuanto a ésto, existe un máximo de velocidad a actividades de agua intermedias, lo que se atribuye a un balance entre los efectos de: difusión controlada por la viscosidad, dilución y acción de masas (Labuza y col., 1970).

Desde el punto de vista de su valor nutricional, los jugos de fruta constituyen fundamentalmente una fuente de **vitaminas** (hidrosolubles y  $\beta$ -caroteno) además de aportar cantidades variables de hidratos de carbono, ácidos orgánicos, flavonoides, fibra y minerales. Por lo tanto, para que este alimento cumpla los objetivos que de él se esperan, desde el punto de vista del aporte nutricional al consumidor, se hace necesario minimizar la destrucción de los nutrientes durante el procesamiento y el almacenamiento. Así, una vez lograda su estabilidad microbiológica y la inactivación enzimática, su vida útil estará condicionada por la **retención** de las vitaminas de las que es fuente. Por ello se hace importante el conocer la estabilidad química de estos nutrientes en ese medio y en las condiciones de procesamiento y de almacenamiento utilizadas.

Entre todas las vitaminas que se pueden encontrar en este tipo de producto, la **vitamina C** es especialmente inestable al ser afectada por muchos factores (luz, oxígeno, temperatura) que conducen siempre a cierto grado de degradación. Pero esta pérdida, además de provocar la disminución del valor nutricional, trae aparejadas reacciones

de pardeamiento no enzimático, las cuales son responsables del oscurecimiento del producto y de la alteración de su flavor durante el almacenamiento, con la consiguiente pérdida de aceptabilidad. Por lo tanto se puede decir que la determinación de **vitamina C** en un jugo de fruta que es fuente nutricional de la misma o que se encuentra particularmente enriquecido con ella, es un **indicador válido de la vida útil del producto**.

Llegar a conocer la cinética de degradación de la vitamina C y la forma en que la afectan los distintos factores capaces de modificarla, permitirá optimizar las condiciones de procesamiento y de almacenamiento, así como predecir el tiempo de vida útil del producto.

### **1.1. VITAMINAS Y COENZIMAS**

Además de sus componentes mayoritarios (proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos y lípidos), las células contienen también unas sustancias orgánicas que actúan en cantidades mínimas: **las vitaminas**. Estas sustancias son vitales para muchas formas de vida: su importancia biológica se manifiesta debido a que **algunos organismos no las pueden sintetizar** y deben adquirirlas, por lo tanto, exógenamente.

Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos: **las hidrosolubles y las liposolubles**.

Vitaminas  
hidrosolubles

Tiamina (B<sub>1</sub>)  
Riboflavina (B<sub>2</sub>)  
Acido Nicotínico  
Acido Pantoténico  
Piridoxina (B<sub>6</sub>)  
Biotina  
Acido Fólico  
Cianocobalamina (B<sub>12</sub>)  
Acido Lipoico  
Acido Ascórbico (C)

Vitaminas  
liposolubles

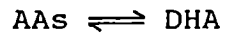
Vitamina A  
Vitamina D  
Vitamina E  
Vitamina K

La función coenzimática de todas las vitaminas hidrosolubles es razonablemente bien conocida, con excepción de la vitamina C (Lehninger, 1982).

### 1.1.1. Vitamina C

#### 1.1.1.a. Generalidades

Con la denominación de vitamina C se identifica a todos los compuestos que poseen la actividad biológica (antiescorbútica) del ácido L-(+)-ascórbico. Su forma oxidada, el ácido deshidroascórbico (DHA), también posee actividad vitamínica ya que la reacción de óxido-reducción:



es reversible en el organismo. Por ello es importante la determinación conjunta del AAs y DHA, cuando se evalúa el contenido de vitamina C de un alimento.

Las plantas superiores y los animales, con excepción de los primates, cobayos y mamíferos voladores como el murciélago frugívoro de la India, son los principales grupos de organismos vivientes que sintetizan el ácido L-(+)-ascórbico (Goodwin, 1963). Los microorganismos aparentemente no lo requieren para su desarrollo. El **escorbuto** es la enfermedad producida en aquellos animales y por supuesto también en el hombre, como consecuencia de la ingesta de dietas pobres o carentes de esta vitamina. Se caracteriza en un principio por agotamiento, debilidad muscular y dolor en las articulaciones, para terminar posteriormente en el característico sangrado de las encías, cambios patológicos en los dientes y tejido gingival, así como también alteración en la formación del tejido de cicatrización de las heridas. Todas estas manifestaciones clínicas resultan de la estrecha relación que existe entre el AAs y la biosíntesis de la proteína fundamental del tejido de sostén del organismo (conectivo y óseo) que es el colágeno, como así también de varios mucopolisacáridos de la matriz del mismo. Esta enfermedad constituyó durante siglos un verdadero flagelo en personas que, como los marineros, se veían obligadas a dietas carentes de vegetales y frutas frescas por largos períodos.



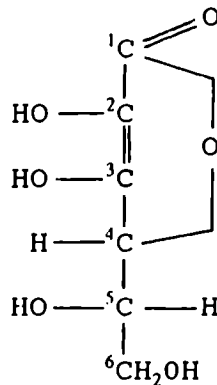
La vitamina C fue aislada primero por Zilva (Levine y Morita, 1985), luego de haber sido reconocida la presencia en frutas cítricas de un "principio antiescorbútico".

Posteriormente Szent-Györgyi (1927; 1928) aisló nuevamente al AAs y lo caracterizó químicamente, llamándolo ácido hexurónico. Zilva (1928) ya había destacado la estrecha relación existente entre la actividad antiescorbútica y el poder reductor de la vitamina.

La actividad biológica del AAs se basa en su elevado poder reductor. Reduce a los reactivos de Fehling y de Tollens, a temperatura ambiente (Sebrell y Harris, 1954).

#### 1.1.1.b. Propiedades químicas

El ácido L-ascórbico es la gamma-lactona de la forma enólica del ácido L-(+)-2-cetogulónico.



ácido L-(+)-ascórbico (AAs)

Nombre químico: ácido L-(+)-2,3,5,6-tetrahidroxi-2-hexeno-1,4-lactona.

Sinonimia (según F.A.VI Edición): ácido cevitamínico, vitamina antiescorbútica, vitamina C.

Fórmula empírica:  $C_6H_8O_6$

Se trata de un ácido diprótico:  $pK_{a1} = 4,17$   $pK_{a2} = 11,79$   
(25°C)

siendo:  $pK_a = -\log K_a$  ;  $K_a$ : constante de disociación  
ácida en agua pura

Su masa molecular relativa es 176,13.

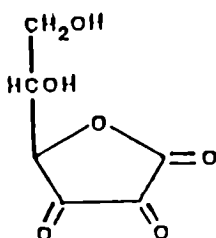
El ácido ascórbico es un polvo cristalino, blanco, inodoro y con sabor ácido. Seco es relativamente estable en el aire, pero en solución se oxida rápidamente.

Es soluble en 3,5 partes de agua destilada y en 25 partes de alcohol; es insoluble en cloroformo, en éter y en benceno.

La sustancia sólida tiene un punto de fusión entre 190° y 192°C, con descomposición.

El poder rotatorio específico a 20°C, de una solución al 2% (P/V) de AAs en  $H_2O$ , no es menor de +22° ni mayor de +23° ( $[\alpha]_D$ ) (Farmacopea Arg., VI, 1978). En cambio una solución al 1,0% (P/V) en metanol tiene un  $[\alpha]_D^{25} = +48^\circ$ .

Su producto de oxidación, el ácido deshidroascórbico, tiene la fórmula empírica  $C_6H_6O_6$ , siendo su estructura la siguiente:



ácido deshidroascórbico (DHA)  
(forma oxidada)

II

El ácido L-ascórbico químicamente está considerado como un azúcar-ácido.

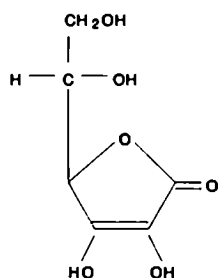
Existen biológicamente tres grupos importantes de azúcar-ácidos:

- ácidos aldónicos
- ácidos aldáricos
- ácidos urónicos (Lehninger, 1982).

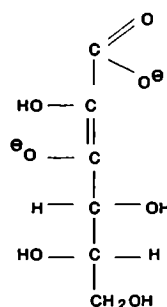
Los ácidos aldónicos y urónicos aparecen en general como lactonas, si es posible que se formen anillos de cinco o seis eslabones, por su mayor estabilidad.

Uno de los azúcares-ácidos más importantes es, justamente, el ácido L-ascórbico, el cual posee, como los ácidos aldónicos, un grupo ácido y un grupo alcohol primario, dando lugar a la formación de la lactona de cinco eslabones por esterificación intramolecular. Para ello, el gamma-hidroxiácido pierde agua espontáneamente.

En general, el tratamiento con un álcali produce la hidrólisis del éster, con lo que el anillo lactónico se abre rápidamente para dar una sal de cadena abierta.



forma lactónica del  
ácido L-(+)-ascórbico

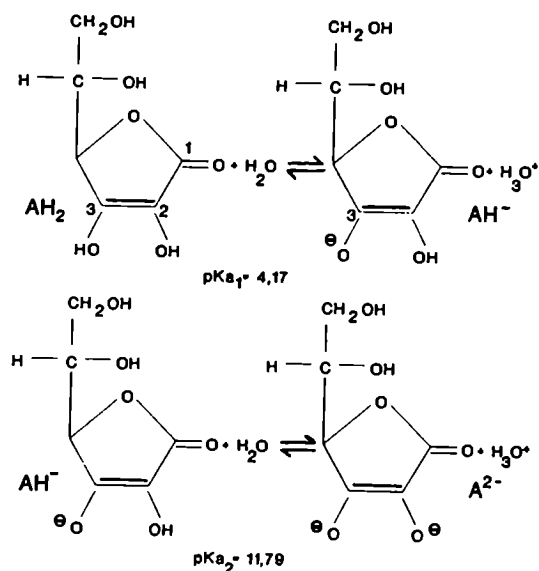


ácido L-2,3,4,5,6-pentahidroxi-2-hexenoico

Sin embargo, en el caso del ácido L-ascórbico su anillo gamma-lactónico es inusualmente estable a los álcalis debido a la gran deslocalización de la carga negativa del monoanión (AH<sup>-</sup>) resultante de la disociación del -OH en el C<sub>3</sub>.

Von Euler y Hasselquist (1952) encontraron que por calentamiento a 100°C del ácido L-ascórbico con solución de hidróxido de sodio 1N en atmósfera de nitrógeno, el anillo de lactona se abre formándose la sal correspondiente del ácido hexurónico.

Por otro lado, el AAs es un agente reductor, propiedad debida a su grupo dienol. A su vez, los dos hidroxilos pertenecientes a dicho grupo funcional presentan disociación ácida en medio acuoso. De esta manera tiene dos constantes de disociación (K<sub>a</sub>) que son muy diferentes.



Teniendo en cuenta estos valores, se puede llegar a conocer qué fracción ( $\alpha$ ) de la concentración total del ácido L-(+)-ascórbico, se encuentra bajo las distintas formas iónicas, a un pH dado.

Siendo: Ca = concentración total del AAs en una solución (pF/l)

$$\therefore Ca = [AH_2] + [AH] + [A^-]$$

donde: [ ] significa concentración formal (F) o molar, y pF significa peso fórmula.

Entonces definimos:

$$\alpha_0 = \frac{[AH_2]}{Ca} \qquad \alpha_1 = \frac{[AH]}{Ca} \qquad \alpha_2 = \frac{[A^-]}{Ca}$$

Reemplazando estas fracciones ( $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) en los lugares correspondientes de las ecuaciones de equilibrio de disociación determinadas por las constantes  $Ka_1$  y  $Ka_2$ , resulta:

$$\frac{1}{\alpha_0} = 1 + \frac{Ka_1}{[H^+]} + \frac{Ka_1 \cdot Ka_2}{[H^+]^2}$$

$$\alpha_1 = \frac{Ka_1}{[H^+]} \cdot \alpha_0$$

$$\alpha_2 = \frac{Ka_1 \cdot Ka_2}{[H^+]^2} \cdot \alpha_0$$

De esta manera se obtiene la siguiente composición iónica en el medio acuoso para los distintos pHs:

Tabla de valores

pH	$\alpha_0(AH_2)$	$\alpha_1(AH^-)$	$\alpha_2(A^{2-})$
0,0	1,000	0,00	0,00
1,0	0,999	$6,75 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^{-14}$
2,0	0,9933	$6,71 \times 10^{-3}$	$1,088 \times 10^{-12}$
3,5	0,824	0,176	$9,04 \times 10^{-10}$
4,0	0,597	0,404	$6,54 \times 10^{-9}$
5,0	0,129	0,872	$1,41 \times 10^{-7}$
6,0	0,0146	0,987	$1,60 \times 10^{-6}$
7,0	0,00147	0,994	$1,61 \times 10^{-5}$
8,0	$1,48 \times 10^{-4}$	1,000	$1,62 \times 10^{-4}$
9,0	$1,48 \times 10^{-5}$	0,99456	$1,62 \times 10^{-3}$
10,0	$1,46 \times 10^{-6}$	0,987	0,01599
11,0	$1,273 \times 10^{-7}$	0,8605	0,139
12,0	$5,647 \times 10^{-9}$	0,3817	0,6184
13,0	$8,60 \times 10^{-11}$	0,0581	0,9418
14,0	$9,08 \times 10^{-13}$	$6,136 \times 10^{-3}$	0,944

$pK_{a1} = 4,17$        $pK_{a2} = 11,79$

Temperatura = 25°C

H<sub>2</sub>O pura

Per Finholt, Paulsen e Higuchi (1963) determinaron para el AAs, un  $pK_{a1} = 3,94$  y un  $pK_{a2} = 10,5$  así como la distribución iónica correspondiente a 96°C, en condiciones de anaerobiosis (bajo nitrógeno) y en un medio acuoso con fuerza iónica 0,50.

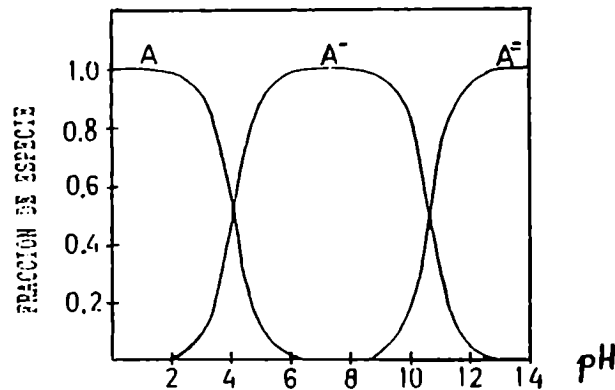
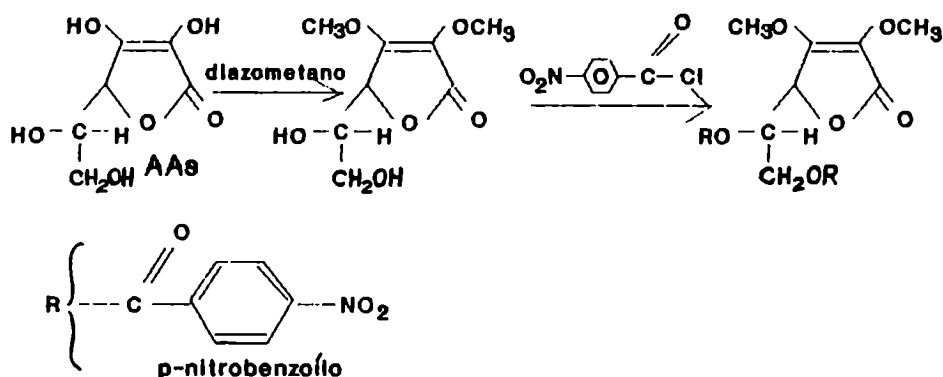


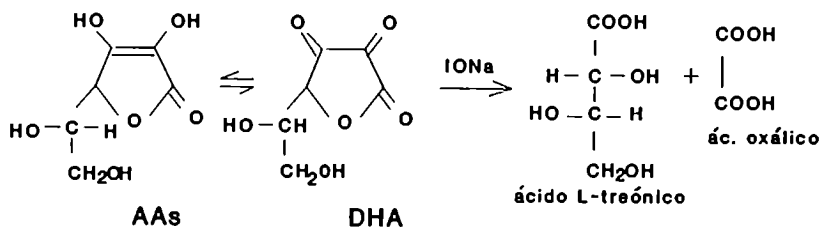
Fig. 1. Fracción de AAs en solución acuosa como función del pH a 96°C, calculada a partir de los  $pK_{a1}$  y  $pK_{a2}$  determinados experimentalmente. A = AAs no disociado; A<sup>-</sup> = ión ascorbato ácido o mono-hidrógeno; A<sup>2-</sup> = ión ascorbato (Finholt y col., 1963).

En la tabla de valores puede observarse que a los pHs que presentan los alimentos (en general, entre 2,0 y 7,0), las especies predominantes son el AAs sin disociación (AH<sub>2</sub>) y el anión monoprótico ascorbato (AH<sup>-</sup>). En los alimentos muy ácidos como los jugos cítricos (pH entre 2,0 y 3,5), el 99 a 82% del AAs está en la forma no disociada. Sólo alrededor de pH 4,0 existen concentraciones casi equivalentes del ácido sin disociar y del anión AH<sup>-</sup>, por ser aquí el pH = pKa<sub>1</sub>. Ya a pH 5,0 (jugo de manzana, por ejemplo) existe un 87% de la vitamina como anión monoprótico AH<sup>-</sup>, manteniéndose éste en elevada proporción (98-99%) hasta pH 10.

El ácido L-ascórbico libera fácilmente CO<sub>2</sub> de soluciones de carbonato y también del bicarbonato, para formar una serie de sales con fórmula general C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Me (Me = Na<sup>+</sup>; K<sup>+</sup>). Por tratamiento con **diazometano** se produce la metilación de los hidroxilos del grupo enólico, resultando un producto sin actividad reductora. Sin embargo, todavía posee un par de grupos hidroxilos normales los que son capaces de reaccionar con **acetona** para dar el mono-O-isopropilidén derivado, o con **cloruro de p-nitrobenzoílo** para dar un producto di sustituido por el resto p-nitrobenzoílo. Como conclusión de estas reacciones se deduce que el poder reductor radica en el grupo enediol y que los dos hidroxilos restantes (de la cadena lateral) son de tipo primario y secundario (Sebrell y Harris, 1954).

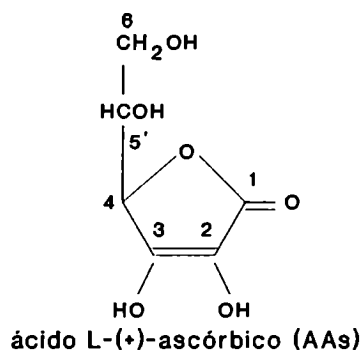


La oxidación con **peróxido de hidrógeno** en solución **alcalina** produce oxalato. La oxidación con **permanganato de potasio** produce ácido L-treónico y dióxido de carbono, mientras que con **hipoiodito de sodio** se producen (cuantitativamente) ácido L-treónico y ácido oxálico.



La identificación inequívoca del ácido L-treónico estableció la configuración asimétrica de los C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> del ácido L-ascórbico.

Se estableció además la estructura del ácido L-(+)-ascórbico como un anillo de cinco miembros en el que el C1 y el C4 están unidos a través del átomo de oxígeno de la lactona.





El ácido L-ascórbico es uno del par de enantiómeros constituido además por el ácido D-ascórbico. El otro par de enantiómeros está integrado por los ácidos D- y L-isoascórbico, los cuales son llamados también D- y L-eritórbico (Liao y col., 1988).

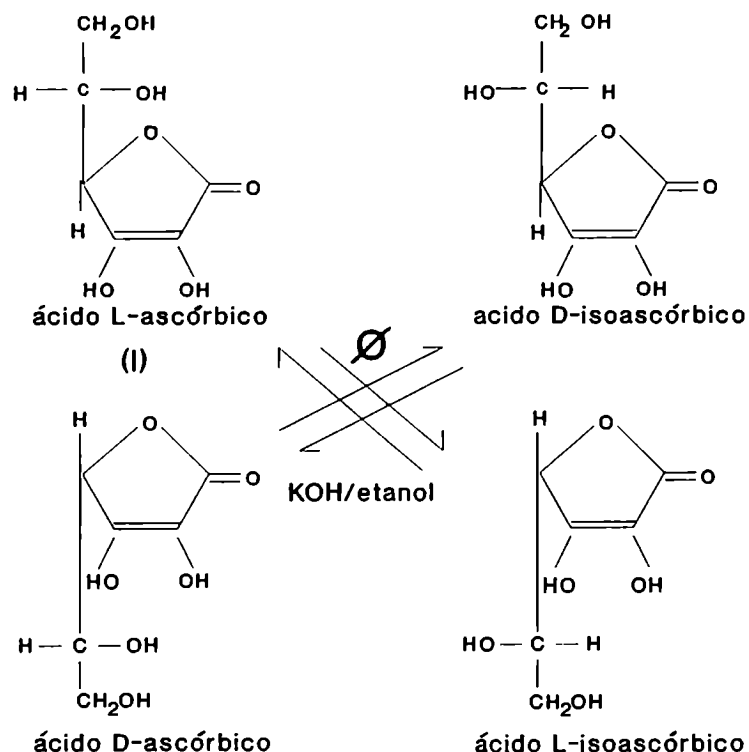


Fig. 2. Diastereoisómeros de 2-hexenono-1,4-lactona y su interconversión (Liao y Seib, 1988).

En la Tabla 1 pueden observarse las propiedades funcionales y actividad antiescorbútica del ácido L-(+)-ascórbico y de sus análogos, observándose que el ácido deshidroascórbico (DHA) tendría una actividad antiescorbútica igual a la del AAs, pero el hecho de que ambos estén en equilibrio, sumados a la posibilidad de la destrucción de la forma oxidada, serían los responsables del 70-80% de actividad biológica observada por algunos investigadores (Cheftel y Cheftel, 1976).

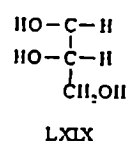
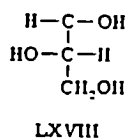
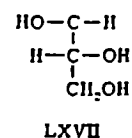
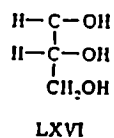
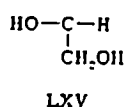
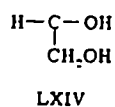
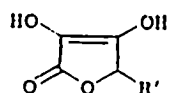
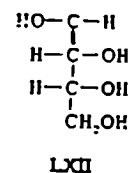
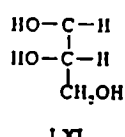
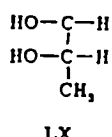
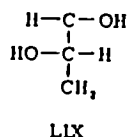
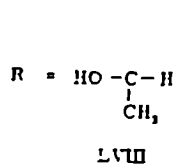
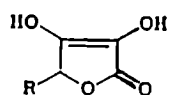
Los restantes compuestos allí observados tienen actividad antiescorbútica mucho más baja.

**Tabla 1. Propiedades físicas y actividad antiescorbútica del ácido L-(+)-ascórbico y sus análogos (Sebrell y Harris, 1954)**

COMPONENTE	SINONIMO	PUNTO DE FUSION (°C)	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>(a)</sup>	ACTIVIDAD <sup>(b)</sup>
L-(+)-2,3,5,6-tetrahidroxi-2-hexeno-1,4-lactona	L-ascórbico (I)	192	+ 23	1
L-(+)-5,6-dihidroxi-2,3-hexadiona-1,4-lactona	Deshidroascórbico (II)	225	+ 55	1
L-(+)-2,3,5-trihidroxi-2-hexeno-1,4-lactona	6-Deoxi-L-ascórbico (LVIII)	168	+ 37	0.3
D-(-)-2,3,5,6-tetrahidroxi-2-hexeno-1,4-lactona	D-Araboascórbico (LI)	174	- 17	0.05
L-(+)-2,5,6-trihidroxi-2-hexeno-1,4-lactona	3-Deoxi-L-gulosacaróscórbico	159	+ 39	0
ácido L-(+)-2,3,5-trihidroxi-2-hexenoico-1,4-lactona	6-Carboxi-L-ascórbico	206-210	--	--
L-(+)-2,3,5,6-tetrahidroxi-2-hepteno-1,4-lactona	L-Fucoascórbico (LIX)	--	--	0.02
L-(+)-2,3,5,6-tetrahidroxi-2-hepteno-1,4-lactona	L-Rhamnoascórbico (LX)	199	+ 28	0.2
L-(+)-2,3,5,6,7-pentahidroxi-2-hepteno-1,4-lactona	L-Glucoascórbico (LXI)	140	+ 24	0.025
	(hidrato)			
D-2,3,5,6,7,8-hexahidroxi-2-octeno-1,4-lactona	D-Glucoheptoascórbico (LXII)	--	--	0.01
L-2,3,5-trihidroxi-2-penteno-1,4-lactona	L-Eritroascórbico (LXIII)	161	+ 9	0
D-(+)-2,3,5,6-tetrahidroxi-2-hexeno-1,4-lactona	D-Xiloascórbico (LXIV)	192	- 23	0
L-(+)-2,3,5,6-tetrahidroxi-2-hexeno-1,4-lactona	L-Araboascórbico (LXV)	170	+ 17	0
D-2,3,5,6,7-pentahidroxi-2-hepteno-1,4-lactona	D-Glucoascórbico (LXVI)	140	- 22	0
	(hidrato)			
D-(+)-2,3,5,6,7-pentahidroxi-2-hepteno-1,4-lactona	D-Galactoascórbico (LXVII)	134	- 6	0
		109		
L-2,3,5,6,7-pentahidroxi-2-hepteno-1,4-lactona	L-Guloascórbico (LXVIII)	184	- 22	0
L-2,3,5,6,7-pentahidroxi-2-hepteno-1,4-lactona	L-Alloascórbico (LXIX)	177	+ 29	0
ácido 2,3,4-trihidroxi-2-butenico-1,4-lactona	Hidroxitetronico	153	(inactivo)	0
ácido 2-amino-2-desoxi-L-ascórbico	----	100	--	0

(a) Rotación en agua

(b) Actividad antiescorbútica relativa a ácido L-ascórbico



La nomenclatura que también puede encontrarse para nombrar a los diastereoisómeros de la 2-hexenono-1,4-lactona, son:

ácido L-ascórbico = ácido L-xiloascórbico  
 ácido D-ascórbico = ácido D-xiloascórbico  
 ácido D-isoascórbico = ácido D-araboascórbico =  
 = ácido D-eritórbico  
 ácido L-isoascórbico = ácido L-araboascórbico =  
 = ácido L-eritórbico

(Liao y col., 1988).

### 1.1.1.c. Propiedades ácido-base

El ácido L-ascórbico puede existir en, por lo menos, cinco formas tautoméricas, tres de las cuales son las siguientes:

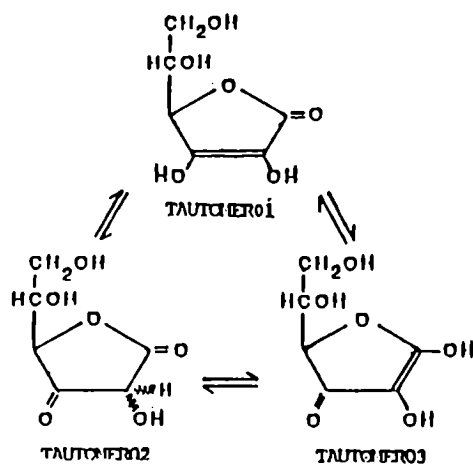
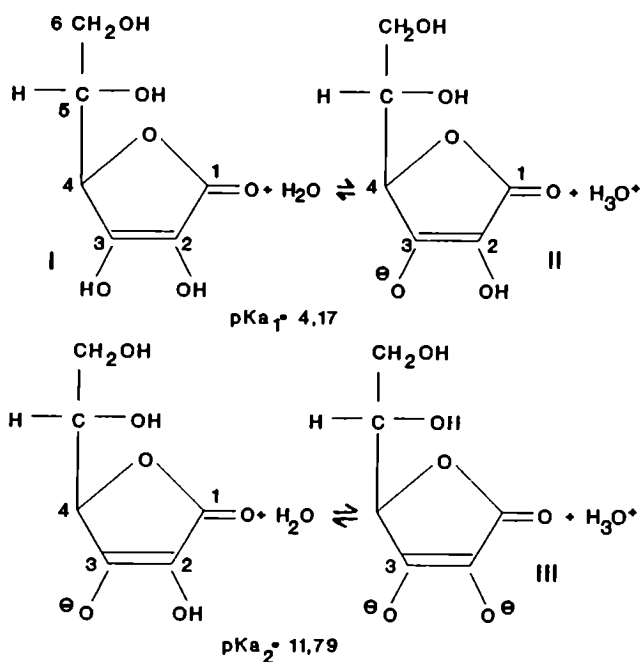


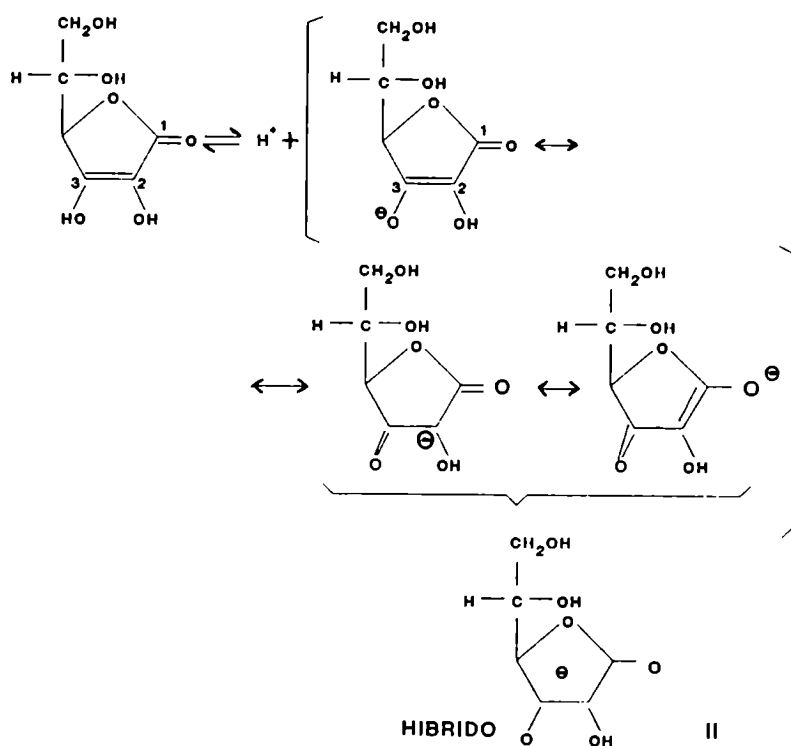
Fig. 3. Tres formas tautoméricas del ácido L-ascórbico (Liao y Seib, 1988).

Los -OH pertenecientes a los C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> son ácidos, y se ionizan en solución acuosa según:



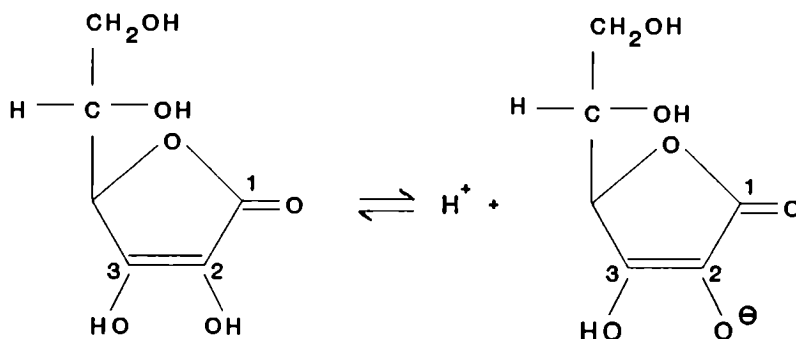
De lo que se deduce que el 3-OH es el ácido más fuerte, mientras que el dianión ascorbato (III) es inestable dado que sólo puede darse a pH > 11,8 (muy alcalino) donde, de por sí, el anillo lactónico es especialmente inestable.

Que sea el 3-OH el que se ionice para dar el monoanión (II), que es el que comúnmente se denomina como ascorbato, es fácilmente explicable químicamente por el hecho que la estructura resultante está estabilizada por resonancia:



En él hay una carga negativa altamente deslocalizada y que constituye un sistema  $\pi$  de 5 átomos. Este hecho otorga una inusual estabilidad al monoanión.

En cambio, si el monoanión se generara por ionización del 2-OH, no resultaría un híbrido tan estabilizado. En este caso la resonancia comprometería sólo a 3 átomos, de los que no formaría parte el 1-carbonilo.



#### 1.1.1.d. Propiedades espectroscópicas

Visto que el ácido-L(+)-ascórbico presenta distintos estados de ionización en solución acuosa, según el pH del medio variará en consecuencia la composición de su solución y, por lo tanto, la longitud de onda ( $\lambda$ ) de máxima absorción. Así tenemos el siguiente perfil de  $\lambda$  en el ultravioleta, en función del pH para dicha solución (Tono y Fujita, 1982):

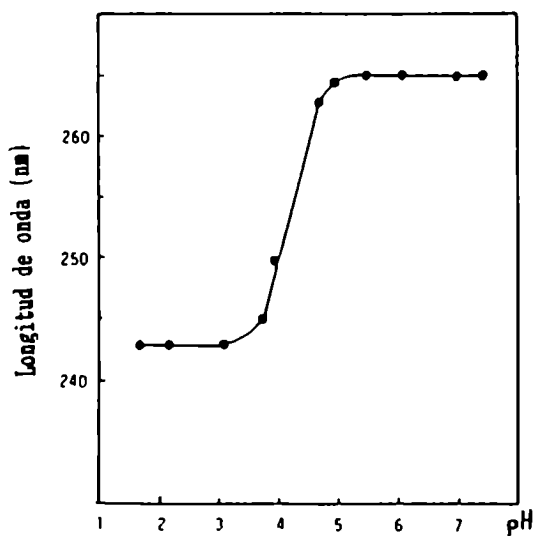


Fig.4. Relación entre pH y longitud de onda a la cual se presenta el máximo de absorbancia para el ácido L-(+)-ascórbico (Tono y Fujita, 1982).

Los datos espectroscópicos en los espectros ultravioleta, infrarrojo y de resonancia nuclear magnética de  $^1\text{H}$  para el ácido L-(+)-ascórbico, se adjuntan en los espectros de las figuras 5, 6 y 7.

L(+)-ASCORBICO

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$

Mol. (PM) 176.13

P.F. 190-192°C

Fuente : The Matheson Co., Inc., E. Rutherford, N. J.

Filter Bandwidth: 4/2 cps  
 Sweep time: 250/500 seg  
 Sweep width: 500/250 cps  
 Sweep offset: -/164 cps  
 Spectrum amp: 25/50  
 Integral amp: 80 (spec. amp. 5)  
 Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$

ASIGNACIONES

a	<u>3.73</u>	o	b	f	<u>        </u>
b	<u>3.84</u>	o	a	g	<u>        </u>
c	<u>4.13</u>			h	<u>        </u>
d	<u>5.00</u>			i	<u>        </u>
e	<u>4.78</u>		HDO	j	<u>        </u>

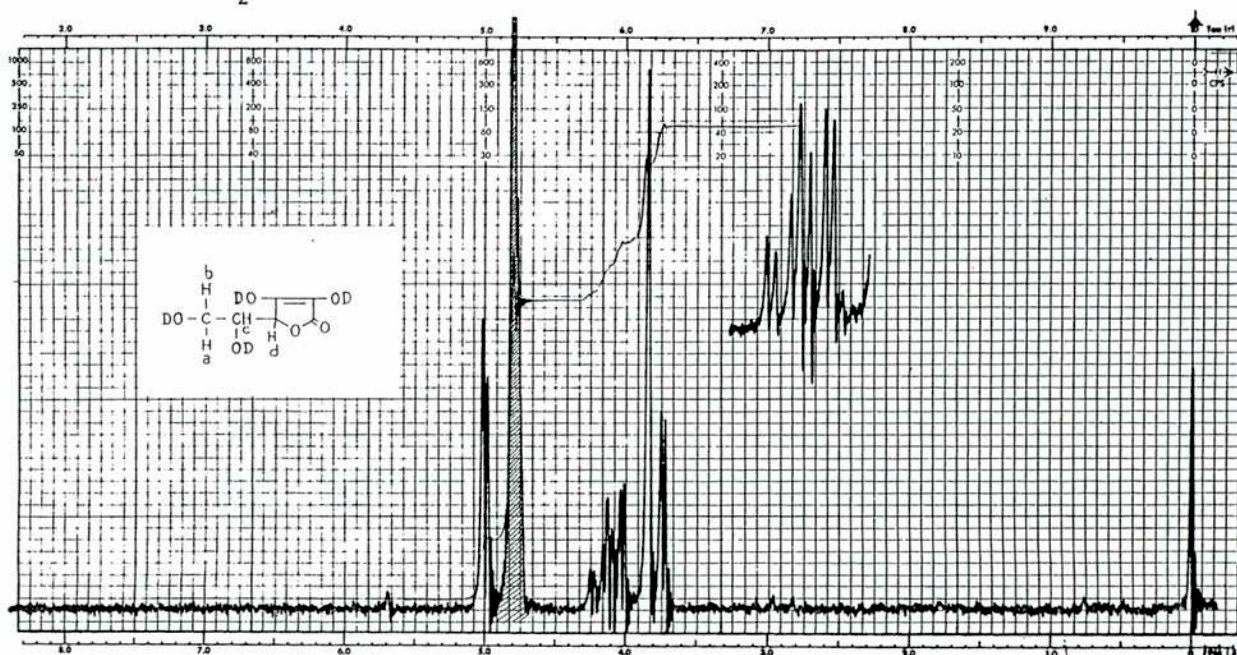
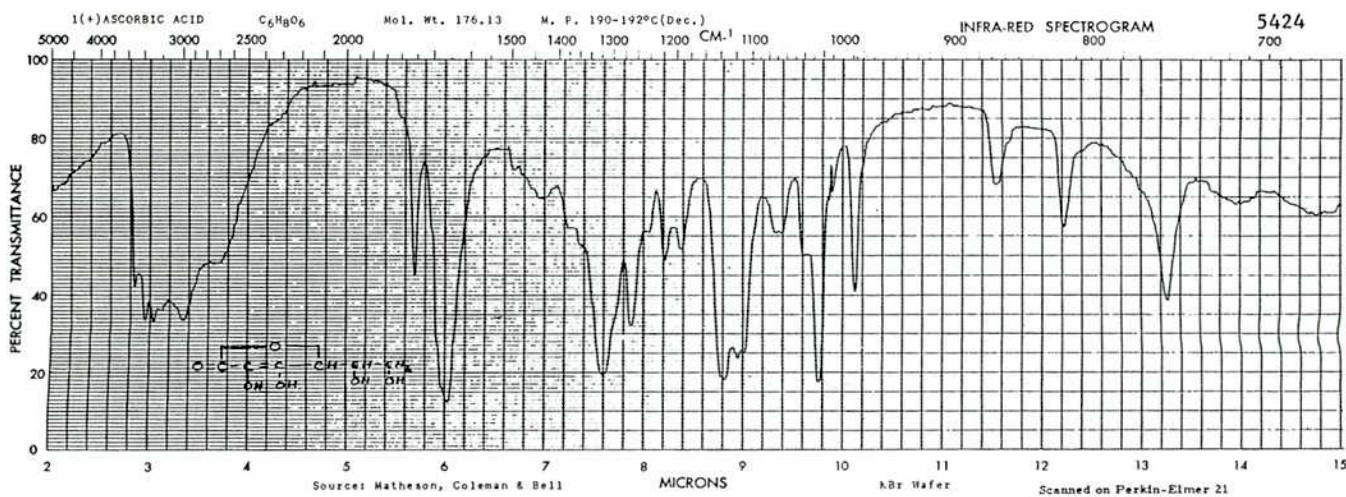


Fig.5. Espectro de resonancia nuclear magnética del ácido L-(+)-ascórbico.







SADTLER RESEARCH LABORATORIES, INC.  
1962 PHILADELPHIA, PA., 19104, U.S.A.

Fig. 7. Espectro de absorción infrarroja del ácido L-(+)-ascórbico, en pastilla de bromuro de potasio.

#### 1.1.1.e. Biosíntesis del ácido L-(+)-ascórbico

Los mamíferos que sintetizan ácido L-(+)-ascórbico lo hacen en su mayoría en el sistema microsomal de las células del hígado, en cambio en los pájaros, reptiles y anfibios, el ácido L-(+)-ascórbico se sintetiza fundamentalmente en el riñón (Goodwin, 1963).

La lesión metabólica que lleva a que los primates, cobayos y mamíferos voladores **no** sintetizen ácido L-(+)-ascórbico radica en la inhabilidad del hígado en convertir D-gulono-gamma-lactona en ácido L-(+)-ascórbico debido a la ausencia de dos enzimas microsomales: **D-glucuronato reductasa** y **L-gluconolactona oxidasa** (Lehninger y col. 1959; Chatterjee y col., 1961).

Tanto en animales como en plantas los precursores del ácido L-ascórbico son la glucosa y también la galactosa. En los animales, la glucosa es de procedencia exógena y también resulta de la gluconeogénesis. En cambio en las plantas, los hidratos de carbono se generan exclusivamente a partir del dióxido de carbono fijado y de la energía aportada a través

de la fotosíntesis. En ellas es necesario el aporte de oxígeno, que actúa como aceptor de electrones, para la síntesis del ácido L-(+)-ascórbico. Ella se lleva a cabo a nivel mitocondrial por estar implicadas enzimas del sistema citocromo-oxidasa.

#### **1.1.1.f. Metabolismo del ácido L-(+)-ascórbico en humanos**

El ácido L-(+)-ascórbico es absorbido en el intestino delgado por un proceso de transporte activo sodio - dependiente. Cuando cantidades entre 4 y 64 mg de ascorbato son ingeridas, la eficiencia de la absorción puede llegar al 98% (menos del 2% aparece en las heces), mientras que cuando se ingieren cantidades mayores a las indicadas, la eficiencia de la absorción decrece al 80-90% si se ingiere hasta 180 mg de AAs y al 50% para 1,5 g de AAs ingerido. La absorción de AAs es significativamente mayor cuando el ascorbato se da con los alimentos, debido a que se hace más lento el tránsito intestinal permaneciendo más tiempo en él (Vinson y Bose, 1983). La vitamina C natural, contenida en los alimentos, tiene una biodisponibilidad significativamente mayor que el AAs sintético, permaneciendo el ascorbato de origen natural mayor tiempo en sangre. Los bioflavonoides que acompañan al AAs natural en los alimentos serían los que mejorarían la biodisponibilidad de la vitamina y tendría también una acción sinérgica con ella en los órganos donde ésta se concentra. Los bioflavonoides (rutina, catequina) previenen la fragilidad capilar y el sangrado en animales escorbúticos (Bentsath y col., 1936).

El ácido L-(+)-ascórbico, una vez absorbido, es transportado en el plasma como monoanión **libre**. Sería transportado también libremente al interior de las células, incluyendo leucocitos y glóbulos rojos. La concentración plasmática de AAs aumenta con la ingesta, hasta alcanzar un máximo de aproximadamente 1,3 mg/dl para ingestas iguales o mayores a 300 mg/día (Jacob y col., 1987).

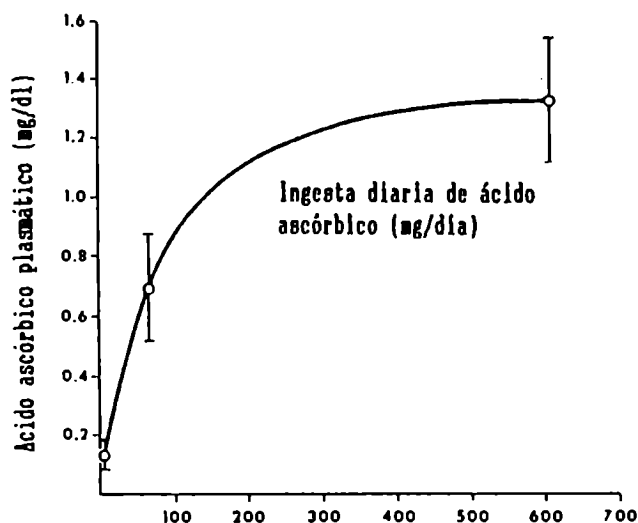


Fig. 8. Ácido L-(+)-ascórbico plasmático como una función de la ingesta diaria (media  $\pm$  SD de tres períodos de ingesta de ascorbato para 11 adultos de sexo masculino) (Jacob, 1987).

Esto significa que la absorción está mediada por un mecanismo de transporte saturable.

Según lo establecido por Blanchard (1991), la caída de la vitamina C en plasma sigue una cinética de primer orden, con un tiempo de vida media inversamente relacionado con la ingesta de la vitamina para concentraciones plasmáticas de la misma por debajo de  $85 \mu\text{mol/l}$ , mientras que por encima de esta concentración, el tiempo de vida media permanece constante y es de 14,2 días sin diferencias por edad ni sexo. Esto indica que existe un mecanismo de conservación para bajas concentraciones plasmáticas y, por otro lado, alcanzada la saturación de los tejidos, el exceso de la vitamina no se acumula, eliminándose del organismo sin metabolizar.

La relación entre la concentración de ascorbato en leucocitos y la ingesta diaria de vitamina C es similar, excepto que el plateau es alcanzado con 60 a 100 mg/día. Sin embargo, el nivel de ascórbico en leucocitos es más representativo del nivel de reserva de la vitamina en los tejidos.

El ácido L-(+)-ascórbico es encontrado en la más alta concentración en ciertos tejidos endócrinos de casi todos los mamíferos. Algunos ejemplos de su concentración en distintos tejidos los podemos ver en la Tabla 2 (Levine y Morita, 1985).

Dependiendo de la ingesta diaria de AAs, el pool corporal total de vitamina C en adultos humanos varía entre < 20 mg hasta 3000 mg. Signos de escorbuto son notados cuando el pool total cae debajo de los 300 mg (1,7 mmoles), mientras que el pool de 3000 mg puede ser mantenido sólo por ingestiones diarias de 200 mg a mayores de 1 g.

La principal vía de excreción del ácido L-(+)-ascórbico y de sus metabolitos es la urinaria. El ascorbato plasmático es efectivamente reabsorbido en el túbulo contorneado proximal del nefrón (97 a 99,5%) para niveles plasmáticos de hasta 0,8 mg/dl (45  $\mu$ M). Para concentraciones plasmáticas mayores, el umbral renal es superado y cae la eficiencia de la reabsorción (con ingestas  $\geq$  60 mg/día, la eficiencia desciende del 98% hasta el 80%).

En el humano, el ácido L-(+)-ascórbico (AAs) es fundamentalmente oxidado, en forma reversible, a ácido deshidroascórbico (DHA) y éste es luego convertido en ácido 2,3-dicetogulónico (2,3-DCG), irreversiblemente, en los distintos tejidos:

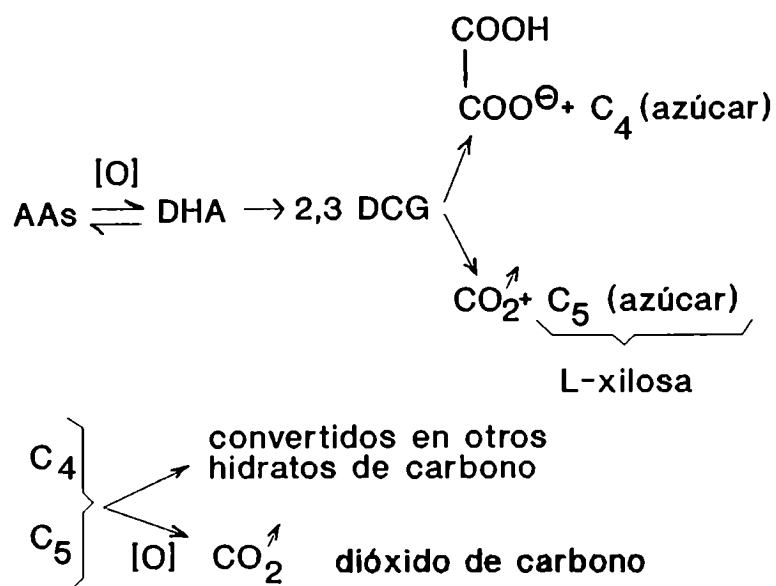


Tabla 2. Concentraciones de ácido L-(+)-ascórbico

Tejido	Acido ascórbico (mg/100 g tejido)
<b>Ratas*</b>	
Glándulas adrenales	280-400
Glándula pituitaria	100-130
Hígado	25-40
Bazo	40-50
Pulmones	20-40
Riñones	15-20
Testículos	
Tiroides	22
Timo	40
Cerebro	35-50
Retina	8-10
Músculo esquelético	5
Músculo cardíaco	5-10
Médula ósea	12
Plasma	1.6
Sangre	0.9
<b>Humano adulto**</b>	
Glándulas adrenales	30-40
Glándula pituitaria	40-50
Hígado	10-16
Bazo	10-15
Pulmones	7
Riñones	5-15
Testículos	3
Tiroides	2
Músculo cardíaco	5-15
Músculo esquelético	3-4
Cerebro	13-15
Páncreas	10-15
Retina	25-31
Plasma	0.4-1.0
Saliva	0.07-0.09

\* Concentración de ácido ascórbico en ratas. Los datos fueron determinados por varios investigadores (modificado por Hornig, 1975).

\*\* Concentración de ácido ascórbico determinada en material biológico obtenido de autopsias de humanos (modificado por Hornig, 1975).

El ácido 2,3-DCG es luego metabolizado principalmente a ácido oxálico y a un azúcar de cuatro carbonos. Secundariamente es también degradado a CO<sub>2</sub> (que se elimina por vía respiratoria) y a un azúcar de 5 carbonos. Ambos tipos de azúcares serán luego metabolizados por su ruta correspondiente, según se indica en el esquema.

Cuando la ingesta de AAs es menor a 100 mg/día, el oxalato es el producto mayoritariamente excretado por orina. Cuando grandes cantidades de AAs (> 1 g/día) se ingieren, la mayor parte se elimina por orina sin metabolizar, mientras que el nivel de oxalato se incrementa sólo moderadamente.

Bowers-Komro y Mc Cormick (1991) determinaron que el proceso de reabsorción de la vitamina es inhibido por D-isoascorbato como análogo estructural y por el ácido DHA. El transporte para la reabsorción del ácido L-(+)-ascórbico es sodio-dependiente y la alteración del gradiente de sodio lo deteriora significativamente.

La glucosa y aniones ácidos no inhiben apreciablemente la reabsorción del ácido L-(+)-ascórbico. A diferencia de otras vitaminas como la riboflavina, piridoxina o biotina, no se conoce para el AAs que el mismo integre activamente un sistema enzimático como coenzima. La reabsorción renal fue demostrada tanto en animales dependientes del aporte exógeno de ácido L-(+)-ascórbico (función vitamínica) como en animales que lo sintetizan (ratas).

El dióxido de carbono producido se elimina por vía respiratoria, pero ésta es comparativamente muy pequeña en comparación con la vía de excreción renal. Una pequeña proporción del AAs absorbido es excretado por heces (circulación enterohepática) junto con el no absorbido.

#### **1.1.1.g. Requerimientos**

Un pool total en el organismo humano de 900 mg de vitamina C (5,11 milimoles) parecería ser el adecuado (Olson y col., 1987) porque:

- a) El es tres veces más alto que el que corresponde al necesario para prevenir el escorbuto.
- b) No existen ventajas en cuanto al nivel de salud con cantidades mayores a las indicadas.
- c) La eficiencia de la absorción es alta y la pérdida urinaria es baja a niveles de ingestión apropiados.

- d) Dicho pool permite afrontar períodos normales de dietas deficientes en la vitamina así como el stress.

Para mantener un pool adecuado, las cantidades requeridas por hombres adultos de 76 kg y mujeres adultas de 62 kg son de 40 mg y 30 mg/día, respectivamente, o en general, una dosis de 0,9 mg/kg/día.

La vitamina C **debe** estar presente en el intestino al mismo tiempo que el hierro no hemínico (procedente de dietas vegetarianas) para que este mineral pueda ser absorbido eficazmente. Pero esto no sería un problema para las personas con dieta vegetariana, pues en ellos está asegurada una elevada ingesta de vitamina C. En cambio la absorción de hierro hemínico (procedente de dietas a base de carnes) no aumenta por la presencia del AAs, lo que significaría que no necesita del AAs para ser absorbido. Teniendo en cuenta estas variaciones individuales, no es recomendable aumentar los requerimientos de vitamina C, pues se corre el riesgo de empeorar el estado de individuos que padecen hemocromatosis (acumulación de hierro en hígado y otros órganos).

Las recomendaciones de 1975-1980 de la RDA (Olson, 1987) se basaban en un pool corporal total de 1500 mg, lo que corresponde a ingestas de 60 mg/día, de manera de obtener la saturación de los leucocitos humanos. A este nivel existe un notable incremento en la pérdida urinaria de AAs **sin** metabolizar, lo que indica un estado de saturación tisular.

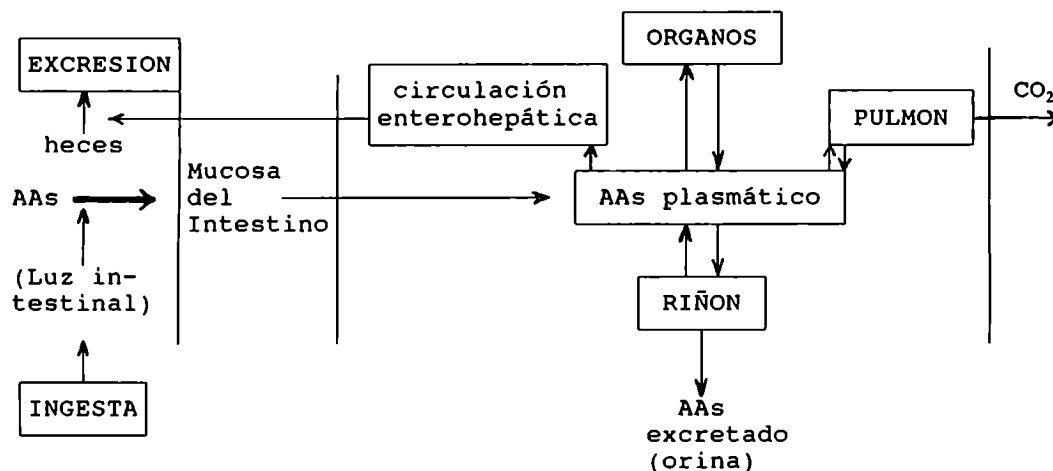


Tabla 3 - Ingesta diaria recomendada (IDR) de vitamina C\* (Olson y Hodges, 1987)

Categoría	Edad	Cantidad (mg)
Infantes	0-2.9 meses	25
	3-5.9	25
	6-11.9	25
Niños	1-1.9 años	25
	2-5.9	25
	6-9.9	25
Hombres	10-11.9 años	30
	12-17.9	40
	18-24.9	40
	25-49.9	40
	50-69.9	40
	70 o mayores	40
Mujeres	10-14.9 años	30
	15-17.9	30
	18-24.9	30
	25-49.9	30
	50-69.9	30
	70 o mayores	30
Embarazo	0-2.9 meses	30
	3-5.9	35
	6-9.0	40
Lactancia	0-5.9 meses	55
	6 o más	50

\* Para convertir mg a  $\mu\text{mol}$ , multiplicar por 5,679.

FAO/OMS (1965; 1973) establecen que una ingesta diaria de 10 mg de AAs es suficiente para prevenir el escorbuto, pero en vista de las variaciones individuales, la ingesta recomendada debe ser de alrededor de 30 mg para el adulto normal. Para los niños se recomiendan 35 mg; lactantes, 20 a 25 mg, cantidad que es cubierta por la leche materna.

Durante el embarazo y la lactancia, las necesidades maternas serían de 60 a 80 mg/día, respectivamente. Además, bajo ciertas condiciones de "stress" continuo y de tratamiento medicamentoso puede existir una necesidad aumentada de esta vitamina (Portela, 1975).

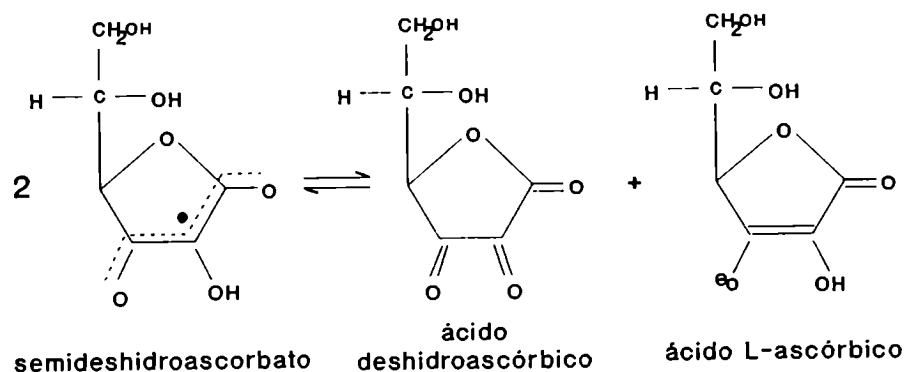


### 1.1.1.h. Funciones del ácido L-(+)-ascórbico en el organismo

El ácido L-(+)-ascórbico es ubicuo y tiene funciones múltiples en todas las células metabólicamente activas de plantas y animales. Sin embargo, esas funciones se resumen en su comportamiento químico como reductor biológico. En este rol, la mezcla de ácido L-(+)-ascórbico y su producto de oxidación, el ácido deshidroascórbico, constituyen un verdadero buffer "redox" (Sapper y col., 1982 a) al actuar, entre otras cosas, destruyendo radicales libres tóxicos resultantes del metabolismo del oxígeno.

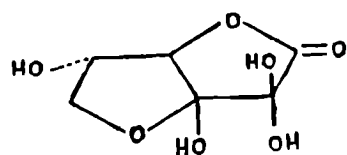
El ácido L-(+)-ascórbico es, por lo tanto, un antioxidante, soluble en agua y que química y biológicamente actúa como donador de electrones a la sustancia principal de la vía metabólica que es la que se va a reducir, en consecuencia. También entrega sus electrones a sistemas enzimáticos oxidados regenerando la enzima en su estado original reducido y listo para entrar en otro ciclo metabólico. En todos los casos, el ácido L-(+)-ascórbico se oxida reversiblemente a ácido deshidroascórbico, pero en la célula existe el sistema enzimático **deshidroascórbico reductasa**, que regenera al primero. Cuando un electrón es transferido desde el ascorbato, el primer producto formado es el radical semideshidroascorbato (Bielski, 1982) que existe como tal a pH fisiológico.

Mezclas acuosas que contienen ascorbato, invariablemente contienen el radical semideshidroascorbato, pero su concentración se mantiene baja (aproximadamente  $0,7 \times 10^{-6}$  M) (Sapper y col., 1982 b; Iyanagi, 1985) debido a que ocurre una reacción de dismutación:

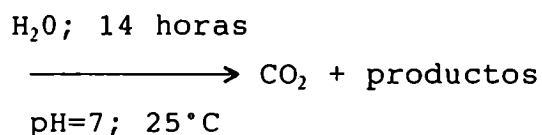


Así, este radical sería un buen agente oxidante y un buen agente reductor (Bielsky, 1981; Sawyer, 1982), produciendo una mezcla 1:1 de AAs y DHA, en aerobiosis.

En solución acuosa, el ácido deshidroascórbico existe principalmente, según algunos investigadores, como estructura bicíclica con un anillo 6,3 hemiacetálico, el anillo de 1,4-lactona y el grupo C-2 diol (Liao y col., 1988). Esta forma del ácido deshidroascórbico se descarboxila a pH 7, mientras que es estable a pH entre 2 y 5.



estructura bicíclica del ácido deshidroascórbico



Puede ser cuantitativamente reducido a ácido L-ascórbico con sulfuro de hidrógeno, ditiotreitól, glutatión, iones estaño (II) y tiourea.

La óxido-reducción reversible del par ácido L-(+)-ascórbico - ácido deshidroascórbico en solución acuosa, difiere de la de sus estereoisómeros (isoascórbico-deshidroisoascórbico) en la estabilidad del producto de oxidación. En el último caso citado la forma oxidada se descompone fácilmente en medio acuoso.

Las funciones del AAs en el organismo son muchas y en su mayoría no son claras.

En un principio, sabemos que está directamente implicado en:

- a) la hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina para la síntesis de procolágeno en el tejido conectivo.
- b) la hidroxilación de la dopamina a noradrenalina en la médula adrenal y en los terminales neuronales del sistema nervioso simpático.
- c) la hidroxilación del triptofano a 5-hidroxitriptofano, precursor de la 5-hidroxitriptamina o serotonina (neurotransmisor en el sistema nervioso central y también secretado por las células cromafines del tracto

- gastrointestinal).
- d) el metabolismo de la tirosina.
  - e) el metabolismo del ácido fólico.
  - f) el metabolismo de la histamina.
  - g) la síntesis de la carnitina, una sustancia que constituye el mecanismo de lanzadera mediante el cual los restos acilo de los ácidos grasos pueden atravesar la membrana de la mitocondria desde el citoplasma, para sufrir la  $\beta$ -oxidación y generar energía (ATP). La carnitina abunda particularmente en el tejido muscular esquelético (fibras rojas) y en el músculo cardíaco. En este último, la fuente de energía principal son los ácidos grasos. La carnitina es sintetizada en el organismo a partir de lisina y metionina. El ácido L-(+)-ascórbico es necesario en dos puntos de la hidroxilación, durante la biosíntesis.

El AAs también afectaría la función de los leucocitos y la respuesta inmune.

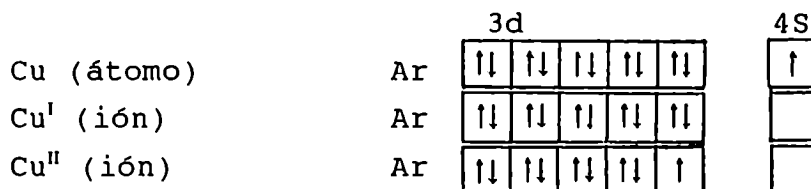
En todos los casos estaría comprobada la vinculación de la vitamina a través de su función reductora y, por ende, dadora de electrones.

Excepto aquellos organismos que están especialmente adaptados a vivir bajo condiciones anaeróbicas, todos los animales y plantas requieren oxígeno para la **eficiente** producción de energía, por ser esta molécula el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria en la mitocondria. Pero el oxígeno suministrado en concentraciones mayores que aquella existente en el aire en condiciones normales, resulta tóxico. También el oxígeno normalmente aportado por el aire tendría con el tiempo el mismo efecto si no existiesen en el organismo moléculas y sistemas encargados de "remover" los metabolitos altamente reactivos que se originan a partir de aquél.

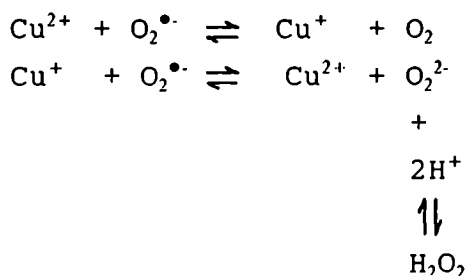
Los metales de transición se caracterizan por tener los orbitales  $d$  incompletos y por lo tanto, con electrones sin aparear, por lo que podrían ser calificados como **radicales**.

Esto hace que sean particularmente reactivos en los procesos de oxidación, donde actúan como catalizadores. Se suma a esto el hecho muy importante de tener valencia variable, lo que les permite cambiar su número de oxidación por intercambio de un electrón. Un ejemplo lo constituye el hierro (Fe) con sus iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . En solución y en presencia de aire, la especie más estable es el  $\text{Fe}^{3+}$ , mientras que el  $\text{Fe}^{2+}$  es un débil reductor y el ión ferrilo ( $\text{Fe}^{\text{IV}}$ ) sería un poderoso oxidante (Halliwell y Gutteridge, 1989).

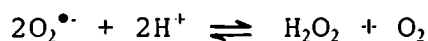
El átomo de cobre no ajusta a la definición de metales de transición, pues todos sus orbitales d están completos. Pero como forma fácilmente el ión  $\text{Cu}^{2+}$ , donde queda con un electrón desapareado en el nivel 3d, posee las mismas propiedades generales de aquéllos:



Así, en determinadas condiciones, las sales de cobre aceptan y donan electrones al reaccionar con el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )



La reacción neta es:



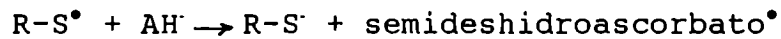
La valencia variable hace que los metales de transición sean participantes en procesos redox y por ello formen parte

de los sitios activos de muchas enzimas que actúan en tales procesos.

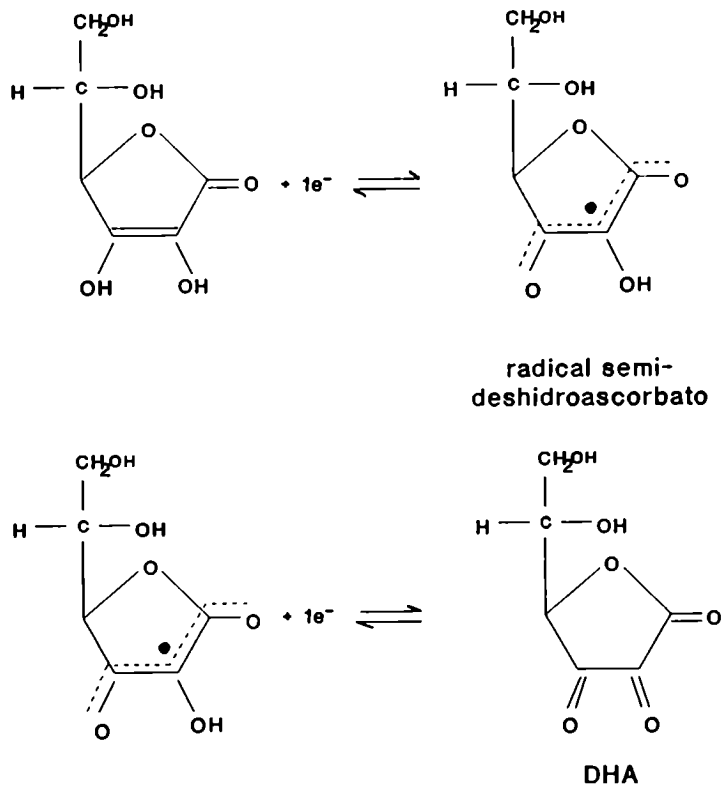
Las moléculas orgánicas en presencia de metales de transición generan radicales libres



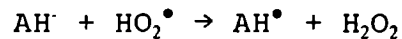
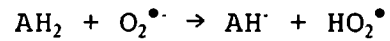
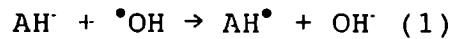
Estos radicales libres pueden reaccionar con el oxígeno, con el NADH y con el ácido L-(+)-ascórbico (AH<sub>2</sub>):



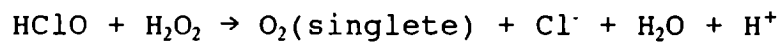
Así, el AAs reduce al radical tihilo (R-S<sup>•</sup>), eliminando este radical libre. El esquema detallado de formación del radical semideshidroascorbato sería el siguiente:



El ascorbato reacciona rápidamente con ión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y con el radical hidroperoxilo formado por protonación del primero ( $^{\bullet}O_2H$ ), y aún más rápidamente con radicales hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ), para dar radicales semideshidroascorbato ( $AH^{\bullet}$ ).

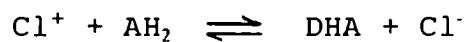


El ácido hipocloroso puede dar lugar al reactivo singlete oxígeno (forma energéticamente excitada de la molécula de oxígeno):

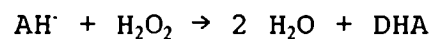


Esta reacción ocurre lentamente a  $pH = 7,4$  ( $pH$  fisiológico).

El AAs, al ayudar a eliminar al ácido hipocloroso generado en los sitios de inflamación en el organismo, evita la formación del singlete - oxígeno, forma altamente reactiva de dicha molécula.



En los sistemas biológicos existe una enzima, la ascorbato peroxidasa, que remueve el agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) acumulada en la célula, al catalizar la siguiente reacción:



En realidad, en los sistemas biológicos existen (Cadenas, 1989):

- a) Defensas antioxidantes primarias
- b) Defensas antioxidantes secundarias

Las defensas antioxidantes primarias incluyen enzimas que actúan de manera análoga a la mostrada para la ascorbato

peroxidasa. Como vimos, ella remueve el agua oxigenada, previniendo la formación de radicales libres. Otras enzimas con funciones análogas son por ejemplo las catalasas y superóxido dismutasa. También, entre las defensas antioxidantes primarias tenemos moléculas pequeñas como el AAs,  $\alpha$ -tocoferol, glutatión,  $\beta$ -caroteno y ácido úrico.

Las defensas antioxidantes secundarias actúan degradando polipéptidos y lípidos derivados de vías metabólicas principales, evitando su acumulación y posible vehiculización a través de la formación de radicales libres. Ellas incluyen enzimas proteolíticas y lipolíticas y otros sistemas que actúan reparando el DNA dañado.

El ácido L-ascórbico es requerido por sistemas enzimáticos como la prolina hidroxilasa, lisina hidroxilasa (enzimas que contienen hierro en sus sitios activos) y dopamina  $\beta$  hidroxilasa (enzima que contiene cobre en su sitio activo). La función natural del AAs es, por lo tanto, la de reaccionar con iones metálicos para revertir su estado de oxidación en el sitio activo y así permitir que ocurra nuevamente la hidroxilación por acción enzimática.

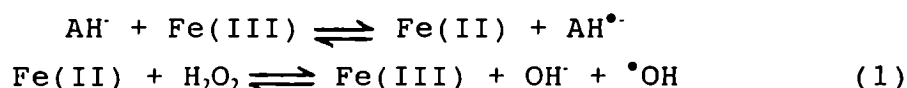
La propiedad química más importante del ácido L-(+)-ascórbico es, por lo tanto, la de actuar como agente reductor (dador de electrones). En base a esto, actúa destoxificando al organismo de radicales libres. La liberación de un electrón por el ascorbato origina el radical semideshidroascorbato, el que luego puede ser oxidado a ácido deshidroascórbico, liberándose un segundo electrón. Esto ocurre en presencia de oxígeno disuelto en solución acuosa. Posteriormente el ácido deshidroascórbico sufrirá la hidrólisis del anillo lactónico para dar ácido 2,3-dicetogulónico, perdiendo su actividad biológica. Este último producto sufrirá un complejo mecanismo de degradación, pudiendo originar, entre otras cosas, ácido oxálico y treónico, como ya fuera oportunamente indicado.

Por lo tanto, los iones de metales de transición catalizan, a expensas del oxígeno molecular, la oxidación del ácido L-ascórbico, siendo las sales de cobre los mejores

catalizadores. El ácido L-ascórbico sería en cambio estable en presencia de iones metálicos pero en ausencia de oxígeno molecular (Joslyn y Miller, 1949).

El cristalino, que es la lente en el ojo humano, tiene elevado contenido de AAs, el cual actuaría como "removedor" de radicales libres en un punto anatómico tan crítico. La exposición de animales a altas concentraciones de oxígeno o al ozono causa disminución en el contenido de AAs en las células epiteliales del pulmón, como también la administración consecuyente de AAs a estos animales disminuye considerablemente el daño celular. En los pulmones, aparece ascorbato acumulado en el fluido que lubrica los espacios aéreos, donde actuaría como un antioxidante extracelular.

Todo esto indicaría que el ácido L-ascórbico tiene extraordinarias funciones de protección como reductor que es. Sin embargo, es necesario también tener en cuenta un efecto prooxidante que su accionar puede, indirectamente, ejercer en determinadas condiciones. Así, el ascorbato podría estimular la formación de radicales  $\cdot\text{OH}$  por la reacción de Fenton, in vivo (Halliwell, 1989):



Este efecto indirecto de acción prooxidante no afectará al sistema si la concentración del AAs en un alimento es suficientemente grande como para remover los radicales generados en la reacción de Fenton (reacción (1)) (Liao y Seib, 1988). De no ser así, el ascorbato puede estimular la peroxidación de los lípidos de membrana bajo ciertas circunstancias.

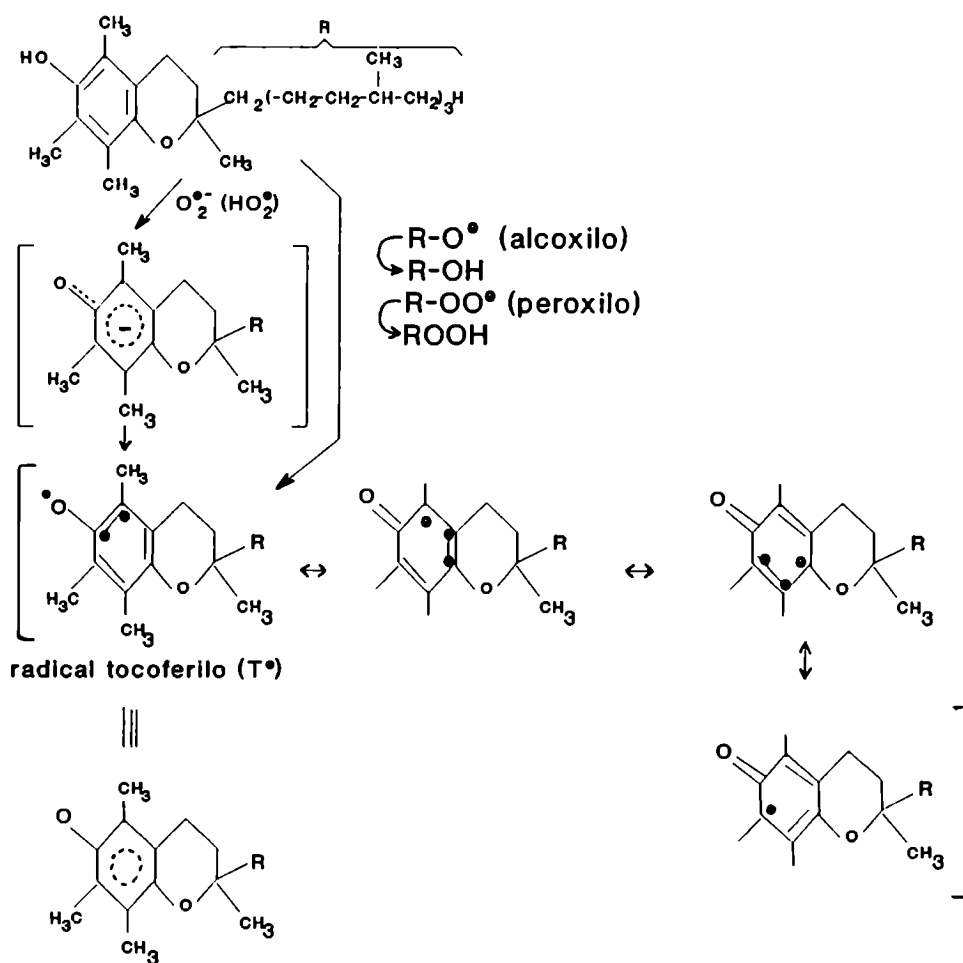
La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol protege a los lípidos de la oxidación, reaccionando con radicales libres peroxilo y alcoxilo de los ácidos grasos poli-insaturados, a los que dona un hidrógeno lábil, frenando así la reacción de peroxidación en cadena del ácido graso. Los  $\alpha$ -tocoferoles son, por lo tanto, "removedores" o "scavengers" de radicales



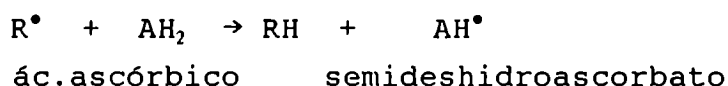
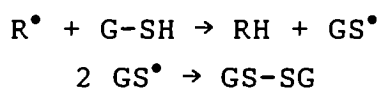
derivados de ácidos grasos altamente insaturados. El ácido L-(+)-ascórbico cumple un papel muy importante en la prevención de la oxidación de los lípidos in vivo, regenerando la vitamina E consumida luego de actuar como antioxidante en la membrana celular intacta.

La adición de ascorbato a membranas celulares conteniendo vitamina E tendrá así efecto antioxidante. Cobayos alimentados con dieta pobre en vitamina C mostraron una disminución del contenido de vitamina E en hígado y pulmones, aún cuando la ingesta de vitamina E fue normal.

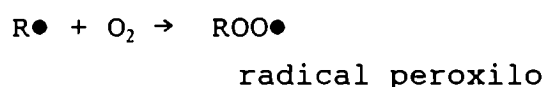
### $\alpha$ -tocoferol



Por otro lado, dado que el agua es el principal constituyente de las células, la exposición de éstas a los rayos X o rayos gamma producirá radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Estos son los principales responsables del daño producido por la radiación ionizante al DNA y a las membranas celulares. La presencia de oxígeno agrava el daño provocado por la radiación. Los radicales  $\cdot\text{OH}$  formados pueden reaccionar con los componentes celulares para producir radicales orgánicos. A menudo, estos radicales orgánicos ( $\text{R}^\bullet$ ) pueden ser "reparados" (neutralizados) por reacción con ácido L-ascórbico o con glutatión (G-SH):



A su vez, existen sistemas enzimáticos que remueven el glutatión oxidado y el semideshidroascorbato, regenerando las moléculas originales reductoras. No obstante, la presencia de oxígeno puede perpetuar el daño formando otros radicales que no pueden ser reparados por sistemas enzimáticos:



La acción del oxígeno sobre nuestro organismo a lo largo de nuestra vida, si bien es esencial para la misma, es también responsable de la existencia de un sinnúmero de reacciones de oxidación mediadas por radicales libres, como ya fuera visto. Este efecto, sumado a la acción de la radiación ultravioleta, va produciendo la acumulación de metabolitos no removibles y la producción de daños en el material biomolecular a lo largo de muchos años, los que llevarían al fenómeno de envejecimiento del organismo,

especialmente de los tejidos de sostén, así como también del tejido nervioso. Dada la participación del AAs, junto con otras moléculas como las vitaminas E y A (o el  $\beta$ -caroteno), como "removedores" de radicales libres, es que se los califica actualmente como "factores antienvjecimiento". Es por ello que ha cobrado notable auge el consumo de estos nutrientes.

Las frutas y los vegetales son las principales fuentes de dos de los más importantes nutrientes antioxidantes: vitamina C y carotenoides, combinados, proveen el 20% de la vitamina E (otro antioxidante) ingerida en Estados Unidos (Block y Langseth, 1994), un porcentaje similar al provisto por grasas y aceites y mayor que el provisto por otras categorías de alimentos.

Estas tres vitaminas juegan un rol crucial en la prevención o retraso de la aparición de muchas enfermedades degenerativas de la vejez tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas. Se cree que los antioxidantes ejercen su efecto contrarrestando los procesos oxidativos que contribuyen a causar estas enfermedades crónicas.

En un análisis de los datos de un estudio nutricional norteamericano, Enstrom y col. (1992) encontraron menor incidencia de enfermedades cardiovasculares en las muertes de hombres y mujeres con alta ingesta de vitamina C. Asimismo, se ha observado que las personas que ingieren pocas frutas y hortalizas presentan el doble de riesgo de contraer cáncer. Un riesgo de igual magnitud se ha observado para los fumadores (Block y col., 1992).

Distintos estudios han también observado la vinculación entre los bajos niveles de vitamina C y el desarrollo de cataratas (Jacques y Chylack, 1991)(Robertson y col., 1989).

Sería entonces importante concientizar a la población sobre la necesidad de comer más frutas y hortalizas en su dieta así como tratar de preservar el contenido natural de estas vitaminas en frutas y hortalizas procesadas, dado que este aporte es el que hace que tales vitaminas estén mucho más biodisponibles respecto de aquéllas aportadas por

diferentes formas farmacéuticas.

Los N-nitrosocompuestos (dialquil N-nitrosaminas, N-alquil-N-nitrosamidas y compuestos relacionados) constituirían un importante grupo de carcinógenos ambientales (Kyrtopoulos, 1987). Su poderosa actividad carcinogénica en animales de experimentación y en células humanas in vitro hace suponer que no tengan un efecto diferente en el hombre. En vista de esto se está pensando en reducir sistemáticamente la exposición del hombre a los N-nitrosocompuestos. Una aproximación a esto implica el uso de AAs para inhibir su formación in vitro e in vivo.

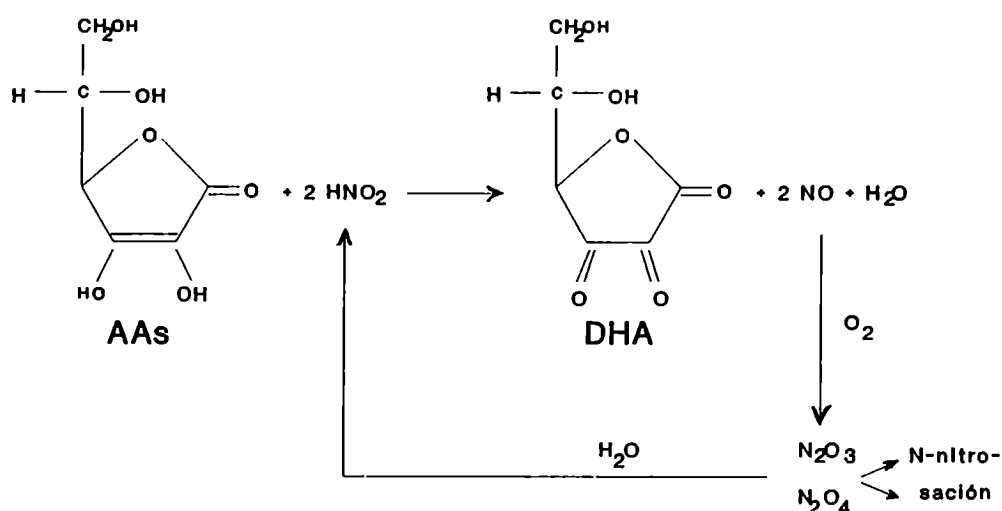
Los N-nitrosocompuestos están ampliamente distribuidos en el medio ambiente (alimentos, bebidas alcohólicas, cosméticos, en el tabaco y en el humo de los cigarrillos). Ello se debe a la facilidad con que se forman a partir de precursores como nitrito, óxidos de nitrógeno del "smog", aminas y amidas. Pero también los N-nitrosocompuestos son fácilmente producidos en el cuerpo humano, primariamente en el estómago, pero también en la cavidad oral, en el colon y en la vejiga infectada.

El AAs natural, proveniente de los alimentos, disminuye considerablemente la N-nitrosación endógena producida en la mucosa gástrica, con amplias variaciones individuales. Los iones tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) presentes en la saliva y jugo gástrico de fumadores son poderosos catalizadores de la nitrosación de aminas en solución a través de la generación de un intermediario nitrosil tiocianato. Similar efecto, aunque menor, tienen los iones haluros: cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), bromuro ( $\text{Br}^-$ ) y ioduro ( $\text{I}^-$ ).

Las personas que consumen habitualmente cigarrillos sufren la exposición continua a elevadas concentraciones de N-nitroso-derivados presentes en el humo, así como a óxidos de nitrógeno y otros agentes nitrosantes, además de elevadas concentraciones de tiocianato que cataliza la nitrosación. Simultáneamente, el nivel plasmático de AAs en los fumadores disminuye significativamente, lo que podría indicar que el AAs está siendo consumido en la mucosa gástrica para inhibir

la nitrosación consecuente. Pero, paralelamente, estaría disminuyendo la protección contra estos derivados.

La reacción del AAs con el nitrito (agente nitrosante) procede con la reducción de dos moles de ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) a óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), por mol de AAs. El óxido nítrico no es nitrosante, pero en presencia de oxígeno puede dar óxidos de nitrógeno que sí lo son ( $\text{N}_2\text{O}_3$  y  $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Esto explicaría por qué algunos autores supusieron que el ácido L-(+)-ascórbico en realidad catalizaba la nitrosación.



Ese efecto catalítico a través del oxígeno presente, puede ser anulado usando un exceso de AAs. Mirvish y col. (1972) demostraron que una relación de AAs/ $\text{NO}_2^-$  de 2 a 1 produjo una completa inhibición de la nitrosación in vitro. También el exceso de AAs bloqueó la nitrosación por agentes más poderosos como los óxidos de nitrógeno. Además, a pH bajos, mejoró la acción inhibidora del ascorbato. En general, la extensión de la inhibición dependerá de las concentraciones relativas de AAs a agente nitrosante.

#### 1.1.1.i. Acido ascórbico en alimentos

Los procesos de preservación de alimentos tienen como principal objetivo extender la vida útil de los mismos para permitir su correcto almacenamiento y distribución. En ello, tres pautas se deben seguir y con igual grado de atención:

estabilidad microbiológica  
valor nutritivo  
calidad organoléptica

Por supuesto que desde el principio del desarrollo de la industria alimentaria, el factor que más preocupó y que se atendió, aún en perjuicio del valor nutritivo, fue la estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico, de manera de crear las condiciones necesarias en el alimento para impedir el desarrollo de bacterias, hongos y levaduras. Así se aplicaron distintos métodos para lograr la preservación: esterilización, deshidratación. Actualmente se busca lograr la estabilidad microbiológica con la menor pérdida posible de valor nutritivo.

Esto es posible aplicando el concepto de "preservación por métodos combinados". Para ello se trata de desfavorecer el desarrollo microbiano aplicando, simultáneamente, distintos factores de stress microbiano. Por ejemplo, combinando el control del pH, del potencial redox, agregando inhibidores químicos de hongos, levaduras y bacterias, y aplicando tratamientos térmicos suaves. De este modo se trata de lograr el objetivo de toda preservación: la estabilidad microbiológica con alto valor nutritivo, buena calidad organoléptica y alta aceptabilidad.

Se desarrollaron entonces los alimentos conocidos con el nombre de alimentos de humedad intermedia (AHI or IMF) con actividades acuosas entre 0,70 y 0,86. Ellos se obtienen mediante una disminución del contenido de agua disponible ( $a_w$ ) a niveles que impiden el desarrollo de microorganismos. En los casos en que la depresión de la actividad de agua no

es suficiente, se combina ésta con la aplicación de otros factores de stress. Resultan así alimentos microbiológicamente estables durante el almacenamiento sin necesidad de refrigeración (Leistner, 1985).

Desde hace algunos años se trata de lograr alimentos microbiológicamente estables, con actividades de agua semejantes a las originales, como es el caso de alimentos con actividad de agua entre 0,90 y 0,95. Teniendo en cuenta que el límite inferior para el crecimiento de bacterias es 0,86 (Ledward, 1982) (para el desarrollo aeróbico del *Staphylococcus aureus*), parecería difícil lograr aquél objetivo en ese rango de actividad de agua tan alto. Sin embargo, con los métodos combinados, el mismo se ha podido alcanzar. Estos alimentos se consumen directamente, sin previa rehidratación. Petriella y col. (1985) destacaron la necesidad de estudiar los cambios en la calidad de los alimentos a valores superiores de actividad de agua como paso previo al desarrollo de productos microbiológicamente estables de actividad de agua entre 0,90 y 0,95. Si observamos el mapa de actividad de agua en los alimentos (Labuza, 1975), vemos que entre 0,90 y 0,95, una vez lograda la estabilidad microbiológica e inactivadas las enzimas, queda por resolver el problema de la estabilidad química del producto: el pardeamiento no enzimático y la oxidación de lípidos, así como además reducir al mínimo la pérdida de otros nutrientes no relacionada con dichas reacciones.

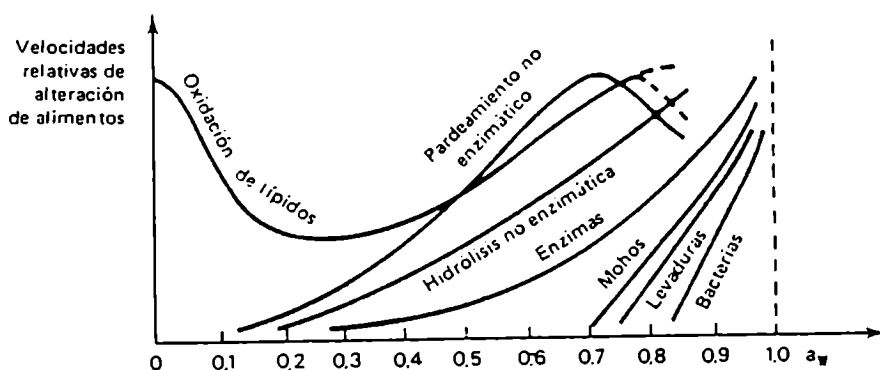


Fig. 9 . Velocidad de alteración de los alimentos, en función de la actividad de agua, según Labuza, 1975 .

Todos los alimentos sometidos a manufactura se hallan expuestos a pérdidas de su contenido de vitaminas, ya sea porque ellas son sensibles al calor, al oxígeno del medio ambiente, a la luz o bien porque **difunden** fácilmente al medio acuoso de lavado, de cocción, o al líquido de cobertura con el que se envasa. Mediante estudios adecuados siempre se han **optimizado los procesos tecnológicos** implicados en cada etapa de elaboración con el fin de **garantizar la calidad** del producto final. Pero además de las pérdidas que pueden darse en mayor o menor grado en estas etapas de la manufactura, existen factores importantes previos, que influyen sobre el contenido de nutrientes. Son los que atañen a la materia prima, que por tener un origen biológico tiene una composición variable según sus características genéticas, grado de madurez, condiciones del terreno, uso y tipo de fertilizantes, clima, disponibilidad de agua, luz (horas de luz e intensidad), así como con las manipulaciones después de la cosecha o del sacrificio. En general, en lo que se refiere a la elaboración de alimentos de origen vegetal, especialmente en el caso de jugos de frutas, se trata de disponer de plantaciones de árboles frutales donde todas las variables son controladas de manera de obtener una materia prima relativamente **normalizada** en cuanto a contenido de sólidos, de azúcares reductores y no reductores, de ácidos orgánicos y de vitaminas. Se pueden elegir variedades genéticas que se ajusten a las características deseables en la materia prima; por ejemplo un mayor contenido de sólidos.

El grado de madurez del fruto es un factor muy importante en cuanto a que condiciona la composición. Por ej., en el caso de los tomates, se ve en la Tabla 4 que el contenido de ácido L-ascórbico varía durante el período de maduración y además la máxima concentración se da cuando el tomate aún no ha madurado.

Posteriormente a la cosecha y previo a la manufacturación, hay también considerable variación en la composición de nutrientes, especialmente si hay un previo almacenamiento, donde en el vegetal sigue ocurriendo el



proceso de respiración y, por lo tanto, siguen existiendo transformaciones por vías enzimáticas además de químicas.

**Tabla 4. Influencia del grado de madurez sobre el contenido de AAs de la variedad de tomates New Yorker (Tannenbaum, 1976)**

Semanas desde la antesis	Peso medio (g)	Color	Acido ascórbico (mg %)
2	33,4	Verde	10,7
3	57,2	Verde	7,6
4	102,5	Verde-amarillo	10,9
5	145,7	Amarillo-rojo	20,7
6	159,9	Rojo	14,6
7	167,6	Rojo	10,1

Resultan también muy variables las pérdidas de nutrientes durante la etapa de preparación, en la cual se separa la porción comestible o utilizable de la corteza, epidermis, etc. Se ha establecido que la proporción de ácido ascórbico es mayor en la piel de la manzana que en la pulpa y que el corazón desechable de la piña contiene mayor proporción de vitamina C que la porción comestible. Se conoce así (Braverman, 1982) la existencia de un gradiente de ácido ascórbico que declina en general desde el epicarpio hacia el endocarpio. Distintas variedades de naranjas mostraron el siguiente contenido (en mg por cada 100 g):

en el flavedo: 175-292 mg%

en el albedo: 86-194 mg%

en la pulpa: 44,9-73,2 mg%

En la guava crecida en Israel, la relación de ácido ascórbico entre el epicarpio, pulpa comestible y el centro de la fruta fue 9:4:1.

Por otro lado, en papas cortadas en tajadas, la cantidad de AAs aumentó de 10,8 mg a 24,1 mg por cada 100 g, en tres días. Esta formación traumática de AAs es considerada como un "mecanismo de defensa".

Una de las vías más importantes de pérdida de nutrientes hidrosolubles, estriba en su extracción de las superficies cortadas o delicadas. Las operaciones que conducen a estas pérdidas son: lavado, arrastre por agua, escaldado, refrigeración y cocción (Tannenbaum, 1976). La naturaleza y grado de la pérdida dependen del pH, temperatura, relación agua-alimento, relación superficie-volumen, madurez, etc. Todo esto también puede originar el deterioro por incorporación de trazas de metales y por la exposición al oxígeno. De las operaciones recién nombradas, el escaldado puede llegar a ser el que origina mayor pérdida de nutrientes hidrosolubles, según la forma en que se lleve a cabo. El mismo se efectúa en alimentos vegetales ya limpios, en forma previa al procesamiento. Tiene por finalidad lograr la inactivación irreversible de las enzimas que son responsables del deterioro de la materia prima. Existe una correlación entre la actividad enzimática y el deterioro del alimento. Así las oxidasas catalizan las reacciones de oxidación de los sustratos naturales contenidos en el alimento por el oxígeno del aire. El pardeamiento enzimático de los tejidos vegetales, particularmente después de la injuria tisular, es debido a la oxidación de los polifenoles naturales. El escaldado se puede realizar por inmersión del material en agua mantenida a temperatura elevada y constante, durante un tiempo determinado; por ejemplo durante 3 min. a 82°C (Cheftel y Cheftel, 1976). Este procedimiento provoca altas pérdidas de nutrientes hidrosolubles **por difusión** al medio de escaldado. También se puede efectuar el escaldado con vapor de agua; en este caso, la difusión al medio puede evitarse siempre que no haya condensaciones. En el escaldado, las pérdidas de vitaminas son, en mayor grado por difusión más que por degradación térmica. En el caso de la vitamina C, ella se pierde también al inicio del escaldado, ya que hasta alcanzar la temperatura de inactivación enzimática, la enzima ascorbato-oxidasa puede actuar, oxidando al AAs.

En la industria alimentaria no sólo se trata de preservar la vitamina C durante el procesamiento y el

almacenamiento, sino que además se la agrega al producto con fines diversos. El principal propósito de esta adición es hacer que el producto sea beneficioso para el consumidor al mejorar el valor nutritivo del mismo y/o mejorar su textura, color y sabor. Este agregado puede ser considerado:

- 1) Restauración
- 2) Fortificación
- 3) Estandarización o normalización
- 4) Preservación de las características del alimento

El primer caso implica incorporar al alimento la cantidad de AAs perdida durante el procesamiento. El segundo consiste en agregar la vitamina a ciertos alimentos que son ampliamente usados, pero que naturalmente no constituyen una fuente importante de aquélla (por ejemplo, jugo de manzana enriquecido con vitamina C). La estandarización o normalización se refiere a agregar la cantidad de AAs necesaria para evitar las variaciones que pueden ocurrir en el aporte que hace un determinado alimento, ya sea por distinta estación climática de cosecha o, en una determinada clase de productos usados intercambiabilmente en la dieta. Esto último es particularmente aplicable a bebidas frutales, de tal manera que, independientemente de la elección efectuada por el consumidor, siempre recibirá un aporte adecuado de vitamina C.

Dado que el AAs sufre un proceso de óxido-reducción reversible (por lo tanto, buffer redox), es aprovechado por esto como **aditivo** conveniente en alimentos con el objeto de demorar cambios resultantes de la oxidación, reducción y actividad enzimática; es así un "preservador" o "mejorador" del producto.

La restauración de los nutrientes en alimentos procesados hasta los niveles originales o naturales, es meritorio per se, pero al hacerlo deben tenerse en cuenta los siguientes factores (Bauernfeind y Pinkert, 1970):

- 1) Accesibilidad del alimento al consumidor.
- 2) Conveniencia de uso.
- 3) Asociación del nutriente a un patrón de alimentación o a productos alimenticios de suplemento o de reemplazo.
- 4) Estabilidad del nutriente en el alimento durante su almacenamiento y durante la preparación del mismo, en el hogar.
- 5) Necesidad de elaborar alimentos especiales: fórmulas para alimentación de niños recién nacidos e infantes, para personas ancianas, alimentos para uso militar, etc.

Por lo tanto, factores diversos condicionan la práctica de la adición de nutrientes.

Se acostumbra agregar **ácido L-ascórbico** para **aumentar el valor nutritivo** de alimentos tales como:

Jugos de fruta.

Bebidas carbonatadas, jugos de fruta concentrados o deshidratados.

Productos lácteos (leche en polvo, yogur).

Papas deshidratadas.

Repollo fermentado.

También se usa el AAs como **aditivo** para alcanzar los siguientes fines:

proteger de la oxidación a grasas y aceites.

prevenir el pardeamiento en frutas congeladas, jugos de fruta y frutas enlatadas.

prevenir la decoloración (y también la alteración del color) en vegetales.

inhibir la rancidez oxidativa en pescados.

estabilizar el color de las carnes rojas (frescas, curadas o enlatadas).

mejorar harinas para la panificación.

Actuar como aceptor de oxígeno en cervezas.  
 Inhibir la oxidación en leche, manteca, quesos, yogur.  
 Evitar la formación de nitrosaminas.

En todas estas aplicaciones, resulta fundamental conocer las perspectivas de estabilidad química del ácido L-ascórbico en las condiciones del medio en el cual se agrega o en el cual se lo encuentra naturalmente, así como las consecuencias posibles de su degradación. Durante la nitrosación en fase lipídica de alimentos, por ejemplo, la eficiencia del AAs resulta limitada por su solubilidad. En este caso suelen usarse derivados del AAs, tales como el palmitato de ascorbilo.

Las carnes curadas contienen nitrosaminas, siendo la N-nitrosopirrolidina y la dimetil-N-nitrosamina las dos más comúnmente encontradas. El AAs reduce la formación de nitrosaminas en tocino cocido mientras que los derivados liposolubles de la vitamina son también muy efectivos en reducir el contenido de nitrosaminas en carne magra y en carne cocida sin grasa (Gray y col., 1982).

**Tabla 5. Inhibición de la formación de N-nitrosamina en tocino por el AAs y sus derivados (Gray y col., 1982)**

Compuesto	Concentración en tocino (mg/kg)	Tocino frito	Grasa cooked-out
Acido ascórbico	1000	100	
Palmitato de ascorbilo	1000 500-1000	59-87	70-90
Acetal de ácido ascórbico	1000	62-88	90-98

El ácido D-isoascórbico, también conocido como D-araboascórbico o ácido eritórbico, es un estereoisómero del ácido L-ascórbico y ha sido usado (por razones económicas)

como **antioxidante** en lugar del ácido L-ascórbico. Por supuesto que no puede ser usado para la fortificación o enriquecimiento de alimentos, pues el ácido eritórbico tiene la vigésima parte de la actividad biológica del ácido L-ascórbico. Tampoco puede reemplazar al ácido L-ascórbico como mejorador de harinas para la panificación, pues las enzimas ascórbico-oxidasa y deshidroascórbico-reductasa no pueden usarlo como sustrato.

Se han estudiado mucho las posibilidades de reemplazo del ácido L-ascórbico por su isómero. Así, se observó que el ácido eritórbico tendría más poder como antioxidante que la vitamina. Investigadores japoneses informaron que una mezcla 1:1 de ambos isómeros es más efectivo contra el pardeamiento de jugo de damasco o jarabes conteniendo 60% de azúcar que cada uno de los isómeros solos (Bauernfeind y Pinkert, 1970).

#### **1.1.1.j. Degradación química del ácido L-(+)-ascórbico**

La degradación química del ácido L-ascórbico ocurre bajo dos tipos diferentes de condiciones:

- a) En anaerobiosis o vía no oxidativa
- b) En aerobiosis o vía oxidativa

según la disponibilidad de oxígeno que exista en el medio de reacción. Así mismo, los productos obtenidos en cada caso son diferentes (Kurata y Sakurai, 1967 a,b,c,).

Por la ruta anaeróbica o no oxidativa, el ácido L-ascórbico se hidroliza para dar la estructura **acíclica** del mismo, la que luego sufrirá enolizaciones y deshidrataciones sucesivas. Esta vía de degradación no depende de la presencia de oxígeno.

En la vía oxidativa o aeróbica, el ácido L-ascórbico se oxida con el **oxígeno** del aire, para dar el **ácido deshidroascórbico**. Este proceso es **reversible**, lo que determina que el ácido deshidroascórbico también tenga

actividad biológica. La posterior hidrólisis del ácido deshidroascórbico, que implica la apertura del anillo para dar ácido 2,3-dicetogulónico provoca la pérdida de la actividad vitamínica, *por ser una reacción irreversible.*

#### ***Ruta no oxidativa***

El ácido L-ascórbico, en medio ácido ( $\text{pH} < 5$ ), es degradado para dar **furfural**, con la formación de 3-deoxi-L-pentosa como intermediario (Kurata y Sakurai, 1967 b). Simultáneamente se libera dióxido de carbono por descarboxilación, que corre paralela a la destrucción del AAs a pHs menores a 7 (Finholt y col., 1965 a). En soluciones fuertemente alcalinas, menos de una molécula de  $\text{CO}_2$  parece ser producida por cada molécula del ácido. La producción del gas es una complicación en muchos casos, especialmente en formulaciones farmacéuticas contenidas en ampollas o recipientes semejantes en los que se pueden llegar a producir fisuras peligrosas, particularmente en el caso de inyectables. En alimentos ricos en la vitamina y envasados en latas selladas, se puede producir el abombamiento de la misma con el riesgo consecuente.

De todas maneras, la producción de  $\text{CO}_2$  predomina a alta temperatura y acidez, con un máximo a pH 4, mientras que otras reacciones comienzan a ser importantes al disminuir dichos parámetros. Por lo tanto se debe tener esto muy en cuenta durante el procesamiento tecnológico, por ejemplo durante la esterilización (Flores y Brunner, 1960).

Kurata y Sakurai (1967 a) sometieron a una solución acuosa de ácido L-ascórbico, regulada a pH 2,2, a las condiciones de cocción resultando una solución ligeramente amarillenta. En ella identificaron la presencia de 3-deoxi-L-pentosa (3-DP) y furfural. Casi los mismos resultados fueron obtenidos en medio de ácido sulfúrico 5%, pero con mayor cantidad de los productos formados. La deshidratación de la 3-DP a furfural es acelerada por el medio ácido.

Se determinó que bajo las condiciones de cocción (calentamiento en baño de agua hirviente, 1 hora), la principal forma de destrucción del ácido L-ascórbico es la vía no-oxidativa, dado que hay mayor formación de 3-DP.

Bajo las condiciones de almacenamiento (38°C - 24 días), el ácido L-ascórbico contenido en jugos concentrados de limón o naranja produjo, entre otras, las mismas sustancias que durante la cocción. Se formó ácido 2,3-dicetogulónico y L-xilosona debido a la presencia de oxígeno, pero la formación de 3-DP y furfural fue invariable, lo que indica que la ruta no-oxidativa no es afectada por la presencia de oxígeno. La deshidratación de la 3-DP no ocurre tan rápidamente durante el almacenamiento como durante la cocción. Como conclusión se puede afirmar que la destrucción del ácido L-ascórbico por la vía **no-oxidativa** ocurre aún en presencia de oxígeno (Kurata y Sakurai, 1967 a).

La destrucción del ácido L-ascórbico trae aparejado el consecuente pardeamiento del producto (pardeamiento no enzimático), siendo, según algunos autores (Kacem y col. 1987) (Kanner y col., 1981), el principal responsable de esta alteración en jugos de fruta y jugos concentrados endulzados con alto contenido de la vitamina (Lee y Nagy, 1988) (Wong y Stanton, 1989).

La determinación cuantitativa del **furfural** se ha podido relacionar con el grado de deterioro de los jugos cítricos durante el almacenamiento (Kanner y col., 1981; Lee y Nagy, 1988; Handwerk y Coleman, 1988).

Cuando se encontró que, en condiciones anaeróbicas, el AAs se destruía más rápidamente en productos frutihortícolas que en soluciones buffers puras, se investigó el efecto que sobre aquél tenían los azúcares, ácidos y compuestos nitrogenados. Huelin (1953) encontró el efecto acelerante de la fructosa sobre la destrucción anaeróbica del AAs, así como el de la sacarosa, debido a su capacidad de hidrólisis para generar fructosa. Asimismo, estableció que la glucosa casi no tiene efecto acelerador.



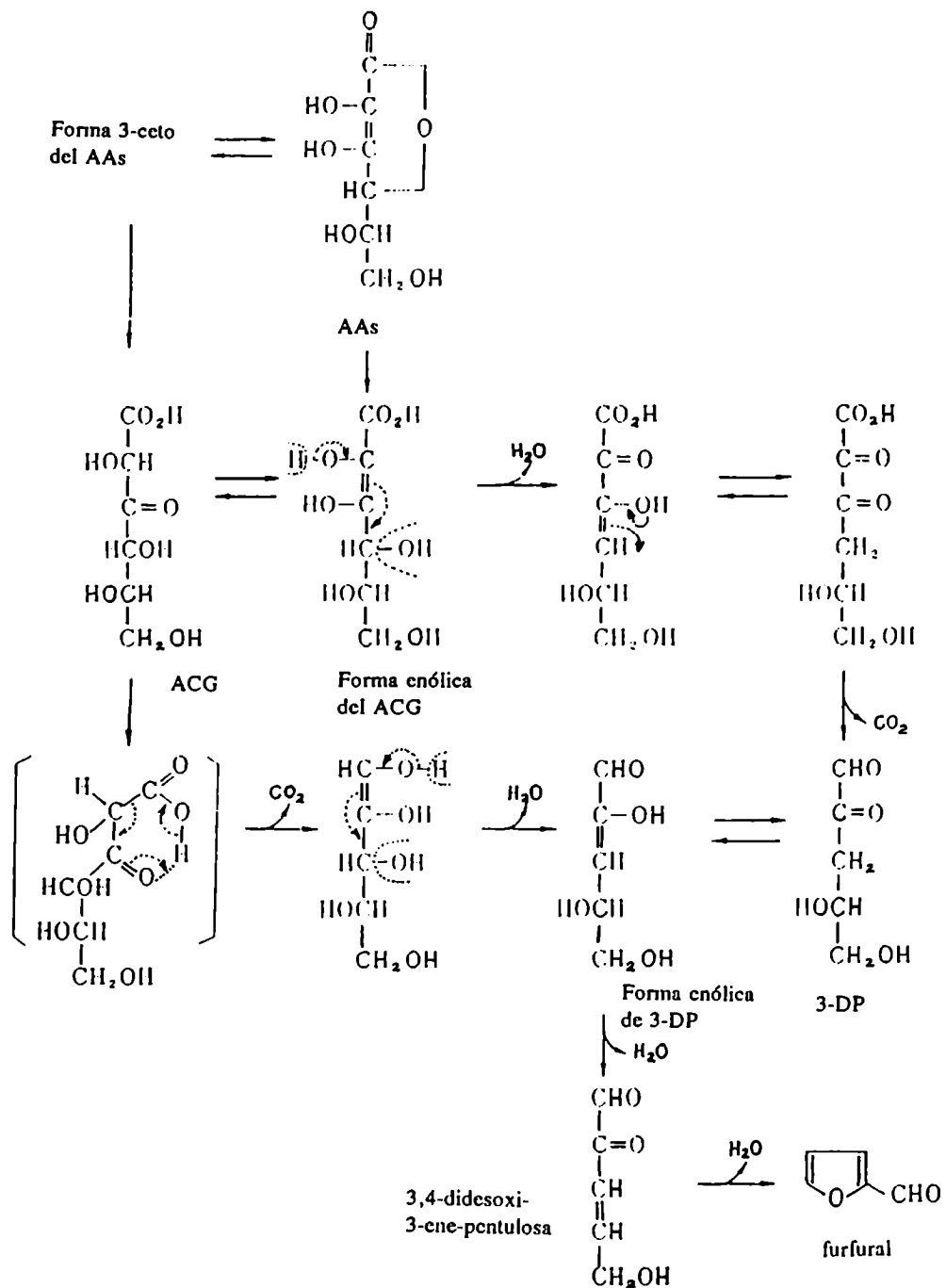


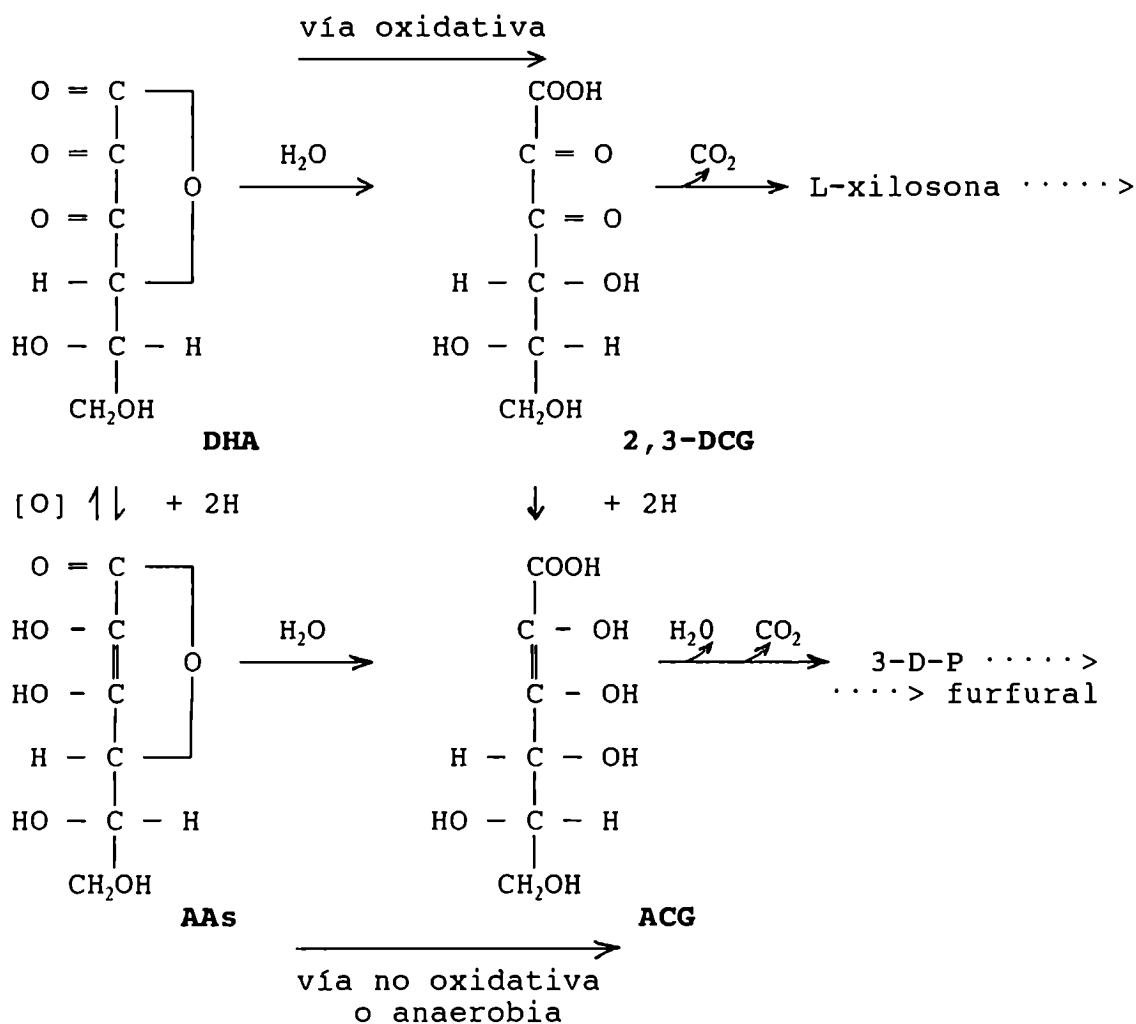
Figura 10. Ruta no oxidativa

### Ruta oxidativa

Con el fin de confirmar el mecanismo de degradación oxidativa del ácido L-ascórbico, el que sólo se da cuando hay oxígeno presente, Kurata y Sakurai (1967 c) analizaron los productos obtenidos por la degradación del primer producto de la vía oxidativa: el ácido deshidroascórbico. Al usar a éste, se aseguraba la ocurrencia única de esta ruta, anulando la vía alternativa no-oxidativa. El tratamiento en medio de

ácido sulfúrico al 5% y bajo las condiciones de cocción permitió aislar furfural, etilglioxal, 2-ceto-3-deoxi-L-pentono-gamma-lactona y L-xilosona.

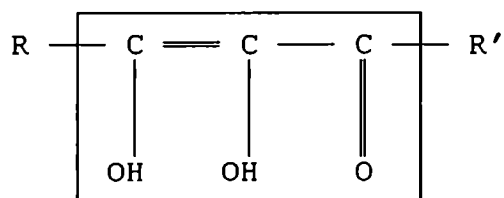
La formación del furfural a partir del ácido deshidroascórbico (DHA) no fue confirmada en un principio, pues se corría el riesgo que éste estuviera impurificado con ácido L-ascórbico, cabiendo por lo tanto la posibilidad de que el furfural se formara por la destrucción no-oxidativa del ácido L-ascórbico. Kurata y Sakurai confirmaron la formación de furfural también por la ruta **oxidativa** y por lo tanto propusieron que aquél se forma por la secuencia de reacciones de la vía anaeróbica, previa reducción del DHA a ácido L-ascórbico. También postularon que el ácido 2,3-dicetogulónico se reduce para dar el ácido gulónico correspondiente (ACG o ácido L-2,3,4,5,6-pentahidroxi-2-hexenoico):



Teniendo en cuenta esto, la figura 11 corresponde a la destrucción de ácido L-ascórbico por la ruta aeróbica u oxidativa, en la cual es necesaria la presencia de oxígeno para que el ácido L-ascórbico se oxide a DHA.

En ella se destaca también la derivación a la ruta anaeróbica donde aparece el furfural. En el esquema de la página siguiente, se ve que el grupo carbonilo del C-2 de los ácidos DHA y 2,3-DCG están hidratados en solución acuosa y la descarboxilación del segundo ocurre a través de la formación de un anillo de 6 eslabones formado por un puente de hidrógeno (IV), produciendo el 1,2-enol del hidrato de L-xilosona. Este compuesto a su vez se deshidrata dando la forma enólica (VI) del ácido 2-ceto-3-deoxi-L-pentónico. Por sucesivas deshidrataciones se forma otro producto final que es el ácido 2-furoico, mediante un mecanismo semejante al que da origen al furfural a partir de la 3-deoxi-L-pentosa (3-DP).

Mediante una serie de reordenamientos aún no confirmados aparecen al final dos productos: **reductona B** y **reductona III**. Se llaman reductonas a los compuestos que presentan la siguiente estructura general:



La acumulación de reductonas produce un aumento del carácter reductor del medio en el que se encuentran, por lo que este tipo de sustancias actúan como antioxidantes. Esta misma estructura es la que está presente en el ácido L-ascórbico. Las reductonas son muy activas en las reacciones de pardeamiento no enzimático. En el momento en que éstas aparecen, la muestra presenta una importante concentración de sustancias fluorescentes, sin que exista pardeamiento perceptible.

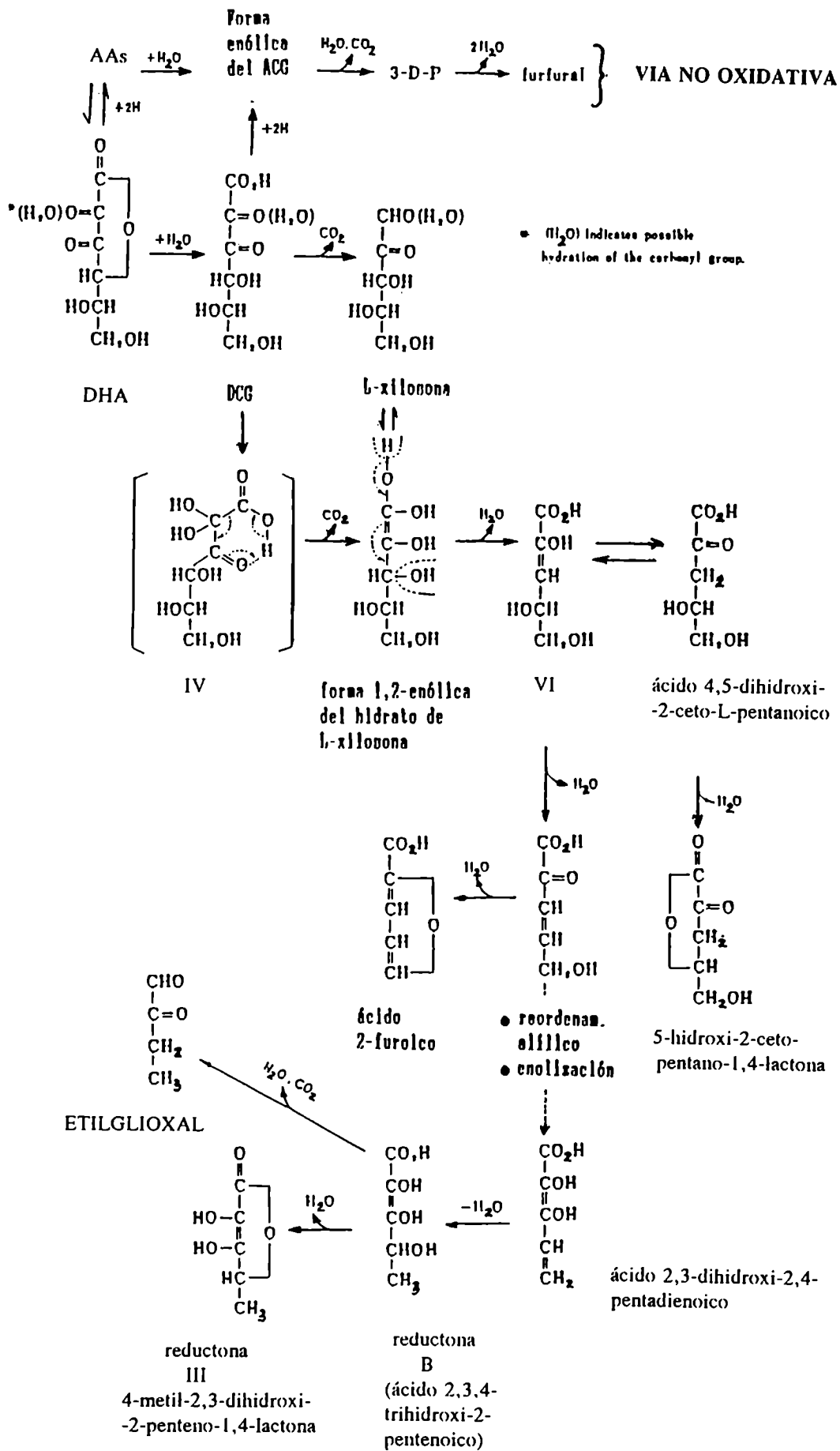
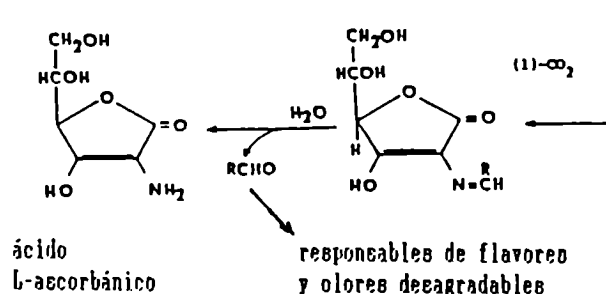
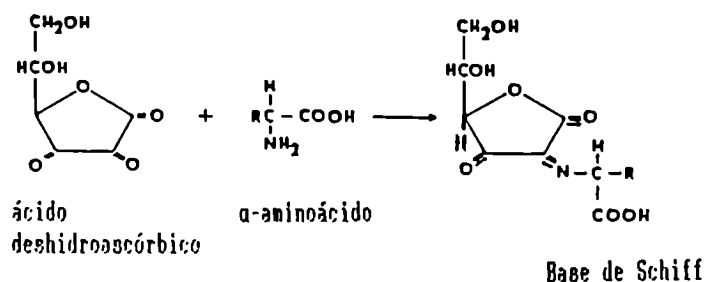


Fig. 11. Destrucción aeróbica del ácido L-ascórbico (Kurata y Sakurai, 1967c).

En la destrucción del ácido L-ascórbico, donde además de existir pérdida del valor nutritivo del alimento se produce la alteración del color y flavor durante el almacenamiento, no intervienen aminoácidos y proteínas. Los productos originados reaccionan con ellos dando lugar a la degradación de Strecker. Se originan así aldehidos de cadena corta que son responsables de sabores y olores desagradables. El ácido deshidroascórbico está implicado en esta reacción (Kurata y col., 1973), provocando así el pardeamiento de jugos cítricos y de algunos alimentos deshidratados. Por supuesto que el pardeamiento también ocurre en ausencia de aminoácidos, como ya se mencionara anteriormente.



**Degradación de Strecker entre el ácido deshidroascórbico y un aminoácido.**

Un pigmento rojo es formado cuando el DHA reacciona con proteínas que contienen restos  $\epsilon$ -amino (de lisina). De esta manera, la caseína y la ovoalbúmina reaccionan con el DHA en un medio con 5% de humedad y a  $60^\circ\text{C}$ , produciendo coloración

rojiza (Hayashi y col., 1985). En un medio con 20% de humedad, la caseína y la ovoalbúmina reaccionan también rápidamente con el DHA pero produciendo pigmentos marrones y sin color rojo visible (Liao y Seib, 1988).

#### **1.1.1.k. Destrucción enzimática de la vitamina C**

La ascorbato oxidasa es una enzima que contiene cobre como cofactor y se encuentra ampliamente distribuída en plantas y microorganismos. La enzima pura es insensible al monóxido de carbono y su pH óptimo de acción es 5,6. Su sustrato natural es el ácido L-(+)-ascórbico, pero la enzima es también activa hacia análogos que contengan el grupo dienol adyacente al carbonilo y hacia compuestos fenólicos polihidroxilados o con grupos amino, incluyendo al 2,6 diclorofenol indofenol (Aylward y Haisman, 1969).

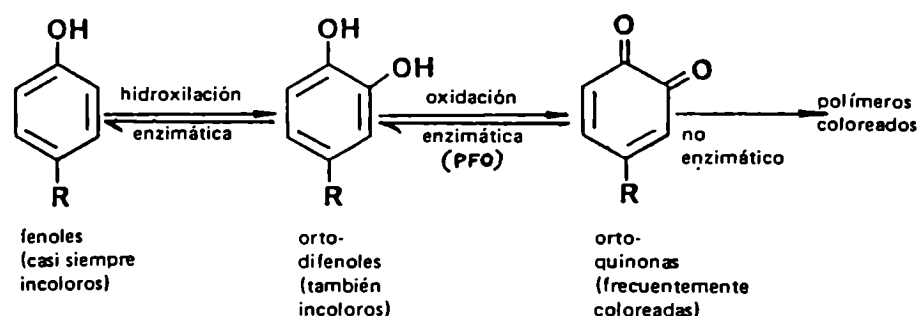
El primer producto de oxidación del AAs es el ácido deshidroascórbico (DHA). La apertura del anillo lactónico del DHA para dar ácido 2,3-dicetogulónico puede ocurrir espontáneamente (por hidrólisis) o también, por catálisis enzimática. Tewari y Krishnan (1961) encontraron que la oxidación e hidrólisis posterior del AAs a 2,3 dicetogulónico son catalizadas por enzimas, en coliflor y tapioca. Además en esta última comprobaron la existencia de un sistema enzimático que degrada al ácido 2,3-dicetogulónico. Este vegetal también contiene un inhibidor natural de la ascorbato oxidasa, el cual estabiliza al AAs natural. Se piensa que la catálisis enzimática es inhibida por el peróxido de hidrógeno producido no enzimáticamente por trazas de cobre libre asociadas con la enzima (Aylward y Haisman, 1969).

#### **1.1.1.1. Pardeamiento no enzimático**

Se conoce como pardeamiento de los alimentos el cambio de color de los mismos con viraje a los marrones por

formación de melanoidinas. Dicho pardeamiento se clasifica, según su origen, en enzimático y no enzimático.

El pardeamiento enzimático es aquél que ocurre como consecuencia del daño del tejido vegetal, en especial, ya sea por el troceado, por el pelado, o bien, cuando los frutos u hojas sufren golpes o aplastamiento. Como consecuencia de ello se liberan las enzimas de las células, tomando contacto con sus sustratos y dando lugar a reacciones de hidroxilación y posterior oxidación. Dichos sustratos son taninos, pirocatecol, dopamina, flavonoides, es decir, compuestos con hidroxilos fenólicos en su molécula. La enzima polifenoloxidasasa (PFO) es la responsable de dichas reacciones, catalizando la oxidación de los compuestos dihidroxilados para dar lugar a la formación de quinonas (cromóforos). Estas luego sufrirán polimerizaciones no catalizadas por enzimas, para formar melanoidinas de colores marrones y pardos.



Estas reacciones, cuando ocurren en la célula intacta, son reversibles y no llegan a la formación de melanoidinas. Cuando ocurren en los tejidos dañados, ya son irreversibles y llegan a la posterior polimerización (Cheftel y Cheftel, 1976).

Cuando se habla del pardeamiento no enzimático (PNE) se sabe que se refiere a una de las siguientes reacciones:

- a) Reacción de Maillard o reacción entre un azúcar reductor y un aminocompuesto.

- b) Destrucción de AAs, ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, en presencia o en ausencia de aminocompuestos.
- c) Caramelización o pirólisis de azúcares.
- d) Oxidación de lípidos, seguido por polimerización.

Un patrón común en las reacciones de PNE es la participación de compuestos carbonílicos como intermediarios reactivos y además la habilidad de los bisulfitos (o del dióxido de azufre o compuestos semejantes: oxaniones de S(IV)) para inhibir, al menos parcialmente, la formación de compuestos coloreados. Estos productos son generalmente denominados **melanoidinas** y probablemente consisten en una mezcla discreta de componentes de alto peso molecular. Usualmente, el color amarillo observado cuando ocurre pardeamiento, es debido al "tailing" dentro de la región del espectro visible, de un intenso pico que absorbe en la región ultravioleta. No existe una única longitud de onda en la que el PNE pueda ser medido dado que se trata de una mezcla heterogénea de productos, donde cada componente absorbe a diferente longitud de onda dentro de un rango definido (Wedzicha, 1984).

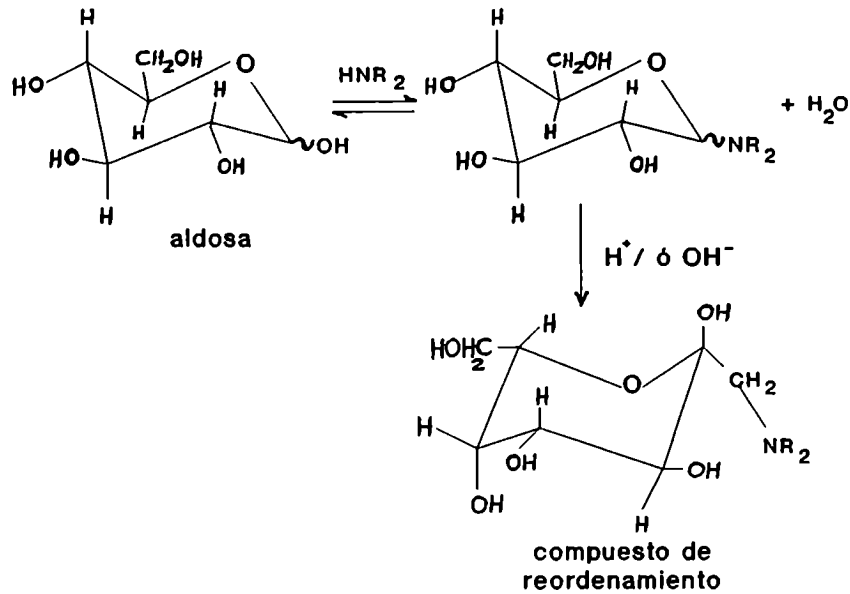
a) **La reacción de Maillard** fue primero descrita por Louis Maillard (Maillard, 1912) como la formación de productos coloreados por calentamiento de una mezcla de azúcares reductores y aminoácidos. Tal reacción ocurre a todos los pHs encontrados en los alimentos y su velocidad depende del pH. Sin embargo, la reacción que lleva a la formación directamente de productos coloreados ya es independiente del pH.

No sólo los aminoácidos sino que la mayoría de las aminas dan lugar a esta reacción con los azúcares reductores: péptidos, proteínas y aún ión amonio (Wedzicha, 1984).

La secuencia de eventos es iniciada por la reacción de condensación entre el grupo carbonilo de la aldosa o cetosa y la amina, como resultado de un ataque nucleofílico por la



amina, para dar la correspondiente aldosilamina o cetosilamina.



La función de los aminocompuestos es estabilizar o retener al azúcar en su conformación de intermediario pseudoacíclico necesario para que tengan lugar las reacciones que llevan a la formación de macromoléculas coloreadas (Buera, 1987). Según que el azúcar reaccionante sea una aldosa o una cetosa, se producirá (en medio ácido o básico) el reordenamiento de Amadori o de Heyns, respectivamente, tal como se muestra en las figuras 12 y 13.

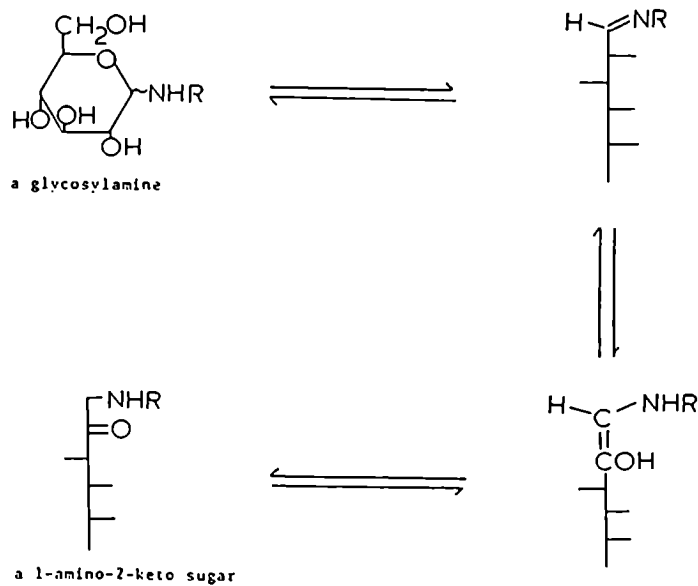
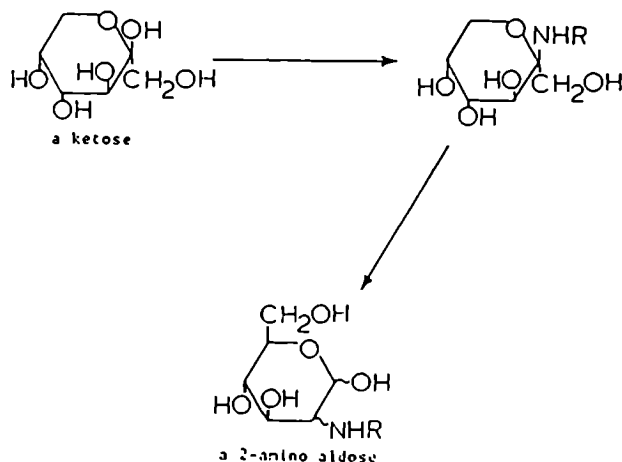


Fig. 12.

a 1-amino-2-keto sugar

Amadori rearrangement of a glycosylamine.

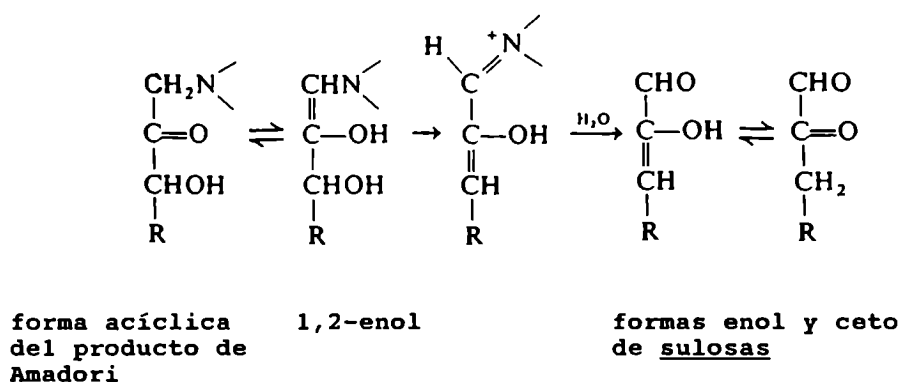


Glycosylamine formation with a ketose and a Heyns rearrangement.

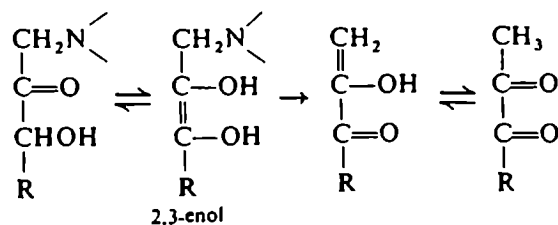
**Fig. 13.**

Cabe destacar que la amino D-glucopiranososa que se forma por reordenamiento de Heyns, a partir de una cetohehexosa (fructosa, por ejemplo), resulta más estable y, por lo tanto, menos reactiva para intervenir en las posteriores reacciones que llevarán al pardeamiento del producto, que la amino D-fructopiranososa, derivada de una aldohexosa (glucosa, por ejemplo), a través del reordenamiento de Amadori.

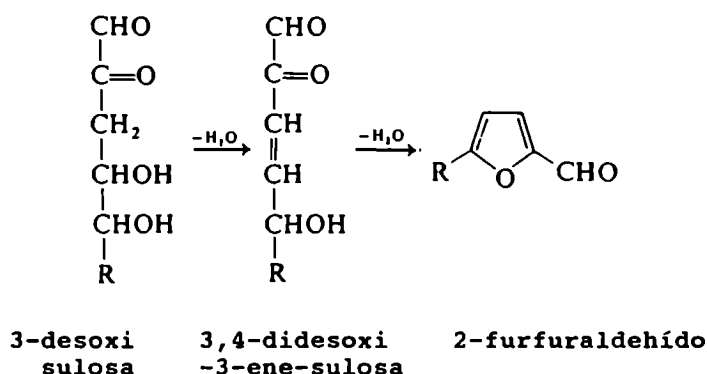
La naturaleza del producto derivado de la monocetosamina depende de si el compuesto de Amadori sufre a continuación una 1,2 o una 1,3-enolización, llevando a la formación de **sulosas**, como se ve a continuación (Anet, 1960):



En contraste, la 2,3-enolización lleva a una deshidrorreductona intermediaria:



Quizás la reacción mejor conocida de las 3-desoxisulosas sea su deshidratación, en la cual dos moles de agua se pierden para dar finalmente 2-furfuraldehído:



Cuando la sulosa deriva de la glucosa, el producto heterocíclico formado es el 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (R = CH<sub>2</sub>OH) o hidroximetilfurfural (HMF).

La degradación de los productos de Amadori llevan así a la formación de compuestos dicarbonílicos (grupos diceto o glioxal). A continuación, un paso común a los intermediarios producidos es la **reacción de degradación de Strecker** (Schönberg y Moubacher, 1952). El mecanismo implica la formación de una base de Schiff entre el compuesto carbonílico y un α-aminoácido, produciéndose finalmente la pérdida de dióxido de carbono por descarboxilación del aminoácido.



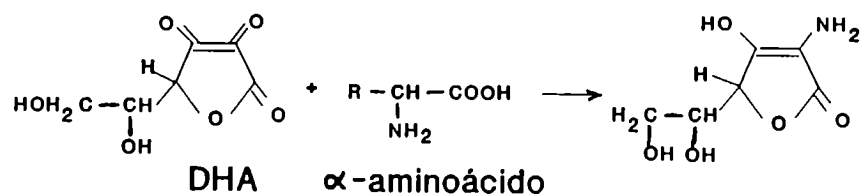
Bajo condiciones anaeróbicas, soluciones acuosas de AAs se descomponen produciendo dióxido de carbono, furfural y ácido 2,5-dihidro-2-furoico. Su descomposición depende del pH del medio y además es acompañada de la formación de color. La velocidad de desarrollo de color es aumentada por la presencia de aminocompuestos (Mori y col., 1967). En la vía de descomposición del AAs, se forman también 3-desoxisulosas, lo que pone en evidencia la necesaria apertura del anillo lactónico en tempranos estadios, acompañada de deshidratación y descarboxilación. Furfural se forma como producto de descomposición del AAs.

El mecanismo de formación de productos coloreados es más especulativo que en el caso del PNE por Maillard. Las desoxisulosas son especialmente reactivas en la producción de pigmentos. Se puede sugerir que en presencia de aminocompuestos, un intermediario importante en el pardeamiento por AAs es justamente la 3-desoxipentulosa.

El pardeamiento por destrucción oxidativa del AAs procede a través del DHA. Este producto parda por se mucho más fácilmente que el AAs, originando en primer término ácido 2,3-dicetogulónico por apertura irreversible del anillo lactónico. Este último compuesto es un  $\beta$ -cetoácido, el cual sufrirá fácil descarboxilación para originar L-pentulosa (L-xilosona).

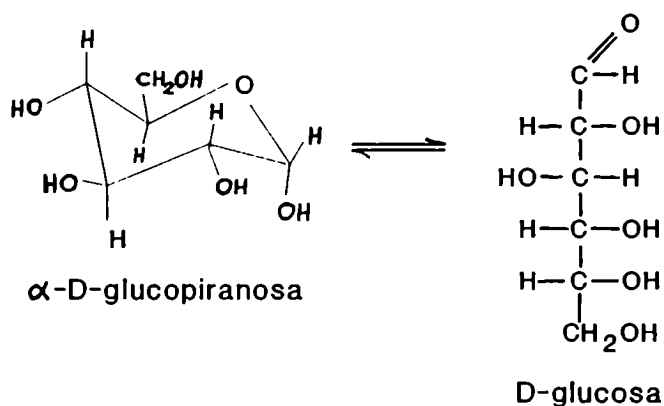
Kurata y Sakurai (1967) determinaron la formación de etilglioxal, ácido 2-furoico, 2-ceto-3-desoxi-L-pentano- $\gamma$ -lactona y dos reductonas. El principal compuesto aromático producido por degradación del DHA es la 3-hidroxi-2-pirona, la que ha sido identificada en jugo de naranja deshidratado almacenado (Tatum y col., 1967).

La producción de compuestos coloreados es debida a la formación de aquellos compuestos reactivos y, en el caso en que estén presentes aminocompuestos, ocurre la formación de pigmentos debida a la reacción de Strecker:



seguida por oxidación del producto a la imina correspondiente. Por nueva reacción de subproductos con el  $\alpha$ -aminoácido sin reaccionar, se originan pigmentos rojos. Estos sufren posteriores reacciones en las que se incluyen aquellas mediadas por radicales libres llegando finalmente a dar pigmentos marrones (Wedzicha, 1984).

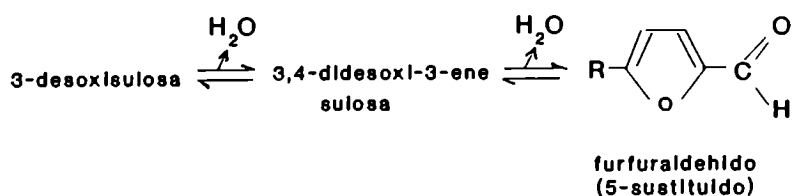
c) La destrucción de azúcares reductores en ausencia de aminocompuestos procede por las llamadas **reacciones de caramelización**, las que son especialmente dependientes de la temperatura. La facilidad con que un azúcar participa en estas reacciones depende del grado de estabilidad de su anillo, es decir, de su equilibrio de mutarrotación en medio acuoso:



La glucosa es la más estable de las aldosas, teniendo su máxima estabilidad a pHs entre 3 y 4.

La fructosa también es más estable entre dichos pHs, pero carameliza más fácilmente que la primera, porque los anillos furanósicos (de 5C) pasan más fácilmente a su fórmula acíclica que los anillos piranósicos (de 6C).

Por sucesivas enolizaciones y deshidrataciones de la forma acíclica del azúcar, se originan aquí también las 3-desoxisulosas. Estas posteriormente se deshidratan y darán:



El esquema general de las reacciones de caramelización puede observarse en la Fig. 14.

La diferencia entre la caramelización y la reacción de Maillard radica en la necesidad de condiciones mucho más vigorosas (alta temperatura) para que ocurra la primera, por estar ausentes los aminocompuestos. Así se formarán compuestos coloreados libres de nitrógeno en su molécula. La descomposición térmica de azúcares origina muchos productos volátiles, responsables de un singular flavor.

Los más altos requerimientos energéticos de la reacción de caramelización la hacen menos favorecida que la reacción de Maillard, de tal manera que, ante la presencia de un aminocompuesto, esta última será siempre la predominante (Wedzicha, 1984).

d) **El PNE por oxidación de lípidos** se debe a la oxidación de ácidos grasos no saturados, siendo el pardeamiento acelerado por la presencia de aminocompuestos. La reacción de los hidroperóxidos (derivados de la oxidación de los ácidos grasos) con un aminoácido, llevan a la

formación de productos fluorescentes.

La oxidación de los ácidos grasos no saturados ocurre en presencia de oxígeno a través de reacciones por radicales libres, llevando a la formación de productos con olores y sabores desagradables.

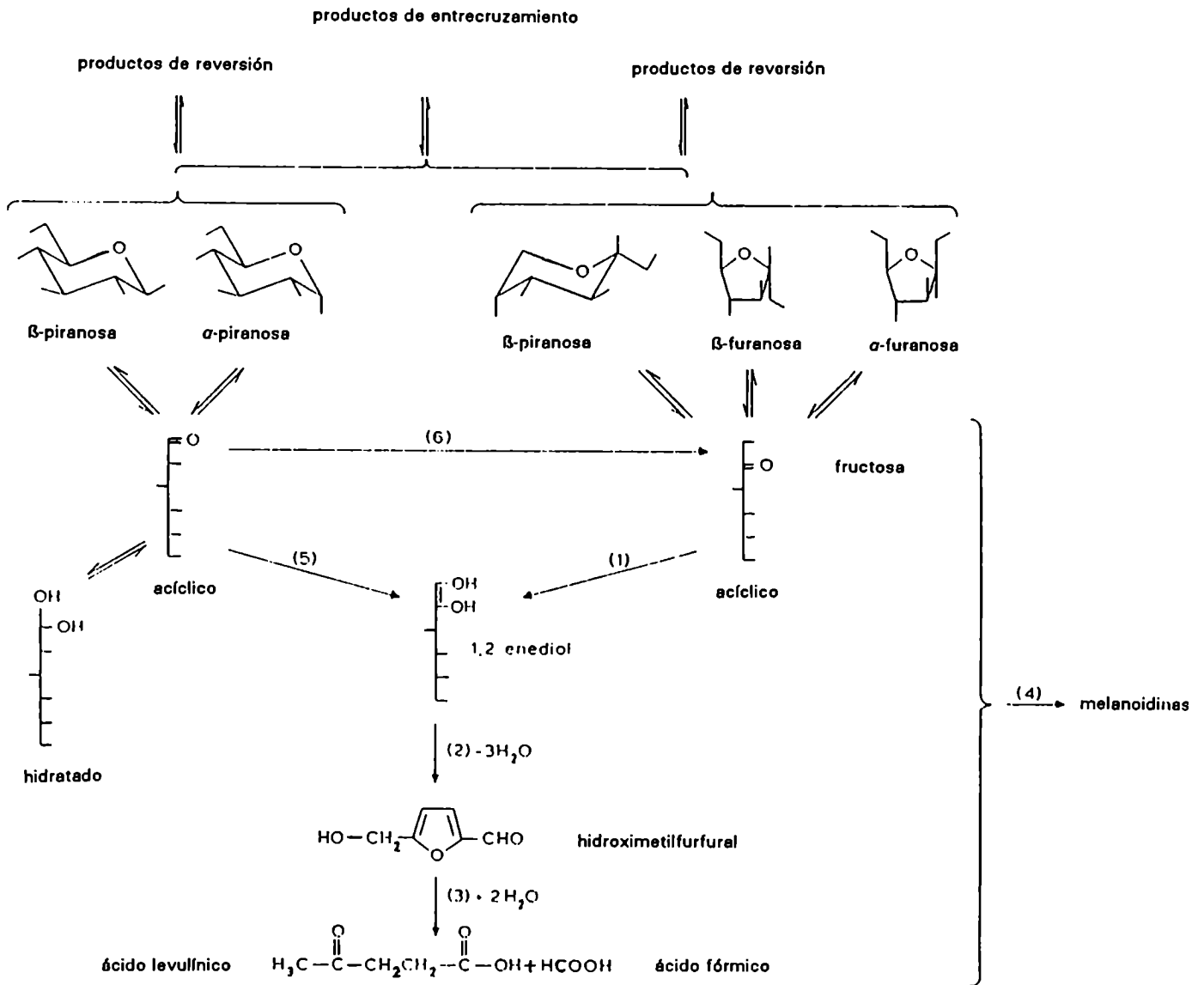


Fig. 14. Reacciones de glucosa y fructosa que ocurren en soluciones ácidas (Van Dam y col., 1986).



## - Acción del bisulfito de sodio

Las oxoespecies del S(IV) son agregadas a los alimentos para inhibir el browning no enzimático (PNE), para inhibir las reacciones catalizadas por enzimas (entre ellas, las del pardeamiento enzimático), para inhibir y controlar el desarrollo microbiano y para actuar como antioxidante o como agente reductor (Wedzicha, 1984).

Las razones por las cuales las oxoespecies del S(IV) ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{SO}_3\text{HNa}$  y especies relacionadas) son agregadas a los alimentos pueden resumirse en la Tabla 6.

Su actividad antimicrobiana está relacionada con sus efectos sobre diversos sistemas enzimáticos celulares. Estos pueden resumirse, en forma general, como aquellos efectos que modifican la reactividad de la enzima hacia su sustrato y aquellos que resultan en cambios específicos en el estado de oxidación del S(IV).

Por otro lado, el más conocido ejemplo de inhibición enzimática por oxoaniones de S(IV), la inhibición de la polifenol oxidasa, previene el pardeamiento enzimático. De todas maneras se debe tener en cuenta que hay distintas isoenzimas de la polifenol oxidasa, las cuales presentan reactividad diferente frente a los oxoaniones de S(IV), siendo algunas resistentes a la inhibición por estos últimos.

La inhibición enzimática por estos compuestos (aditivos) puede ocurrir por una o más de las siguientes formas:

- a) Por reacción con grupos disulfuro de las proteínas, llevando a la modificación de la estructura.
- b) Por reacción con coenzimas ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ).
- c) Por inactivación de grupos prostéticos y co-factores (FAD, folato, hemo, piridoxal, tiamina).
- d) Por competición por el sitio activo de la enzima.
- e) Por remoción de reactantes.

**Tabla 6. Efecto preservativo del oxanión de S(IV) en diversos alimentos**

	Inhibición del pardeamiento no enzimático	Inhibición de enzimas	Inhibición de microorganismos	Antioxidante	Agente Reductor	Otros
- <b>Carne, pescado y productos proteicos</b>						
(a) enlatados, procesados por calor	X				X	
(b) deshidratados	X			X		
(c) frescos y luego pasteurizados			X	X	X	
- <b>Productos vegetales</b>						
(a) enlatados, procesados por calor	X					
(b) deshidratados	X	X <sup>a</sup>				
(c) congelados		X <sup>a</sup>				
(d) frescos		X				
(e) encurtidos	X		X			
- <b>Productos frutales</b>						
(a) enlatados, procesados por calor	X					
(b) deshidratados	X					
(c) congelados		X				
(d) pasteurizados	X	X	X			
(e) frescos, para manufacturar		X	X			
- <b>Bebidas</b>						
(a) vino y jugos de frutas	X	X	X			
(b) cervezas			X	X		
- <b>Producción de almidón</b>						
- <b>Productos panificados</b>		X	X	X		X
- <b>Producción de azúcar</b>	X		X			X

(a) Inhibición de enzimas estables al calor si el producto es escaldado.

Basado en información publicada por Roberts y McWeeny (1972), con mínimos cambios (Wedzicha, 1984).

En alimentos líquidos y sólidos los oxocompuestos de S(IV) más comúnmente usados como aditivos son las sales de sodio o de potasio del bisulfito (sulfito ácido) o el gas dióxido de azufre, conocidos comúnmente como agentes de sulfitado.

Cuando se sulfito un alimento debe tenerse en cuenta que una parte se pierde por oxidación a sulfato y otra por reacción con componentes diversos del alimento (antocianinas, aceites esenciales naturales, agentes colorantes artificiales) o por pérdida a través del film que constituye el envase (en el caso de un material mal elegido) o por degradación a través de la corrosión metálica del material en el enlatado (Wedzicha, 1984).

El sulfitado de jugos de frutas y bebidas no fermentadas se hace específicamente para prevenir el pardeamiento enzimático y no enzimático, siendo este último el causante del deterioro organoléptico en el caso de jugos pasteurizados (jugo de limón, por ejemplo). El bisulfito retarda el pardeamiento no enzimático pues inhibe la formación de pigmentos, aunque la reacción sigue procediendo, lo cual se prueba por la formación de los intermediarios fluorescentes.

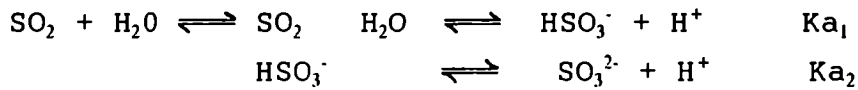
El dióxido de azufre es bastante soluble en agua (3937 ml/100 g a 20°C y 1877 ml/100 g a 100°C, conteniendo la solución saturada un 53,5% de SO<sub>2</sub> en condiciones normales de presión y temperatura).

Las soluciones de gas en agua obedecen a la ley de Henry en un amplio rango de concentraciones (0,0025 molal hasta por lo menos 1,5 molal), siendo los valores de la constante de Henry de 3,28 a 0°C; 1,23 a 25°C y 0,56 a 50°C (Johnstone y Leppla, 1934).

Desde ya, la solubilidad es afectada por la fuerza iónica del medio.

El SO<sub>2</sub> en solución acuosa existe como tal, con débil interacción de la molécula de SO<sub>2</sub> con las moléculas de H<sub>2</sub>O, y por eso a menudo se lo expresa en este estado como SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O.

El SO<sub>2</sub> reacciona con el agua para dar ácido sulfuroso:



$$\text{Ka}_1 = 1,39 \times 10^{-2} \text{ (25}^\circ\text{C)} \quad \text{corregidas a fuerza}$$

$$\text{Ka}_2 = 6,61 \times 10^{-8} \text{ (25}^\circ\text{C)} \quad \text{iónica cero}$$

Si el gas reacciona con el agua en la solución, la ley de Henry no se aplica a la concentración total de gas disuelto, pero aún puede aplicarse al gas que no reaccionó. Por lo tanto, en el caso del dióxido de azufre:

$$\text{Ka}_1 = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{SO}_3\text{H}^-]}{[\text{SO}_2]}$$

La solubilidad de dióxido de azufre a 1 atm de presión de este gas, es aproximadamente 1,80 moles/l.

Por lo tanto, en dicha situación y suponiendo despreciable la concentración de  $\text{SO}_3^{2-}$ , por ser  $\text{Ka}_1 \gg \text{Ka}_2$ :

$$[\text{SO}_2] + [\text{SO}_3\text{H}^-] = 1,80 \text{ M} \quad (2)$$

y entonces:

$$[\text{HSO}_3^-] = [\text{H}^+] = \sqrt{\text{Ka}_1 [\text{SO}_2]}$$

Como la concentración de gas disuelto que no reaccionó con el agua está en equilibrio con su presión parcial ( $p_i$ ) según la siguiente ecuación:

$$p_i = H_e \cdot [\text{SO}_2]$$

donde  $H_e$  es la constante de Henry, resulta entonces que (2) será:

$$\frac{p_i}{H_e} + \sqrt{\text{Ka}_1 \frac{p_i}{H_e}} = 1,80 \text{ M}$$

Teniendo en cuenta las constantes de ionización en agua, las cantidades relativas de las especies  $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}^-$  y  $\text{SO}_3^{2-}$  presentes en equilibrio en dicho solvente a distintos pHs se observa en la figura 15.

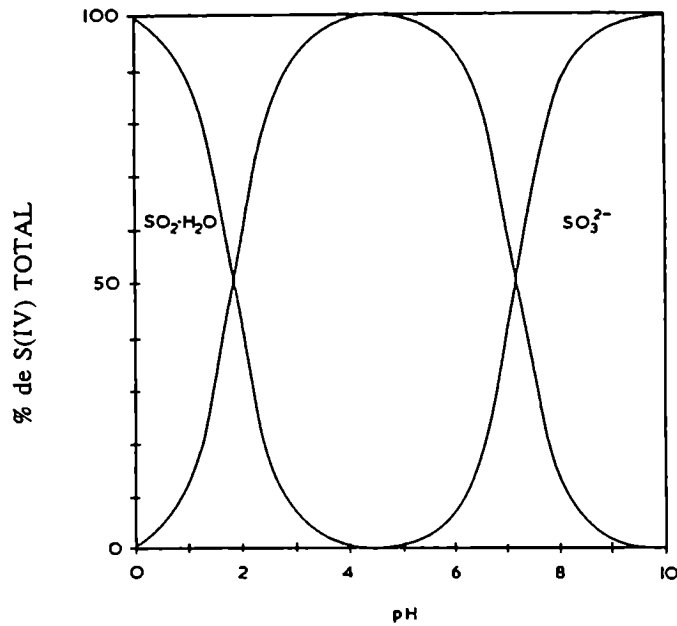


Fig. 15. Distribución de las especies  $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HSO}_3^-$  and  $\text{SO}_3^{2-}$  como una función del pH en solución diluida.

En el rango de pH de los alimentos (3-7) predomina la especie química sulfito monoácido ( $\text{SO}_3\text{H}$ ).

Cuando está presente en alimentos, el bisulfito (o  $\text{SO}_2$ ) total puede ser encontrado en tres formas químicas, las cuales son distinguibles por los métodos analíticos utilizados para la determinación de dióxido de azufre:

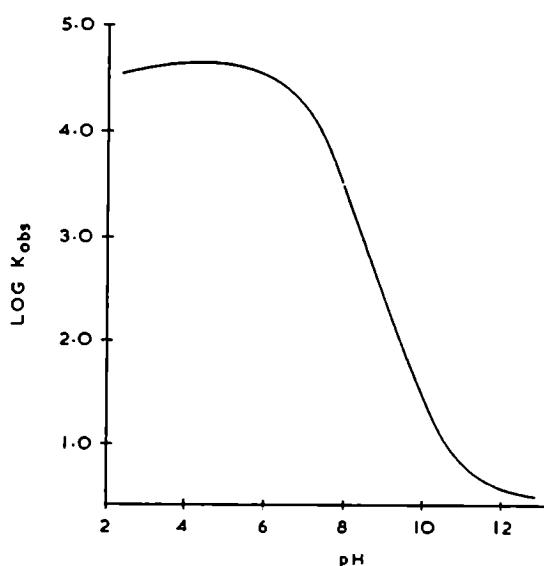
- 1 - Oxoanión azufre (IV) libre.
- 2 - Oxoanión azufre (IV) unido reversiblemente.
- 3 - Oxoanión azufre (IV) unido irreversiblemente.

La legislación requiere la determinación del **dióxido de azufre** (expresado como tal) libre y reversiblemente unido. El primero se dosa acidificando la muestra; el segundo requiere un tratamiento con álcali, previo a la acidificación. Este último análisis da el  $\text{SO}_2$  total (libre + reversiblemente unido), respectivamente. Por diferencia con el primer análisis se conoce el  $\text{SO}_2$  reversiblemente unido.

La más importante contribución a la fracción de  $\text{SO}_2$  reversiblemente unida, proviene de la presencia de grupos carbonilo en el alimento y la diferencia a partir de aquí

entre "libre" y "reversiblemente unido" depende también de la estabilidad relativa de los distintos compuestos de hidroxisulfonatos, durante el análisis del aditivo "libre" y su tendencia a no recombinarse durante el análisis del aditivo "total", después de la descomposición alcalina. Las constantes de formación de los hidroxisulfonatos con un gran número de aldehídos y cetonas son elevadas y casi independientes del pH entre pH 2 y 6, pero pasan por un mínimo alrededor de pH 2 (figura 16), por lo que a este pH hay que llegar para hacer la determinación de  $\text{SO}_2$  "libre".

En la figura 16 se ve que a pH mayor de 10 los hidroxisulfonatos se descomponen (por alcalinización del medio), liberando el carbonilo y el anión sulfito.



**Fig. 16.** La variación de la constante de equilibrio para la formación del aducto hidroxisulfonato del isobutiraldehído con el pH, en agua a 25°C, según Green y Hine, 1974 (Wedzicha, 1984).

Las combinaciones irreversibles del bisulfito (o del  $\text{SO}_2$ ), resultan de la formación de productos orgánicos e inorgánicos que no se descomponen liberando bisulfito en las condiciones del análisis.

## - Inhibición del pardeamiento no enzimático por bisulfito

Cuando los oxoaniones del S(IV), como por ejemplo el anión bisulfito, son agregados a un sistema que contiene aldosas y aminoácidos, el tiempo requerido para que comience a observarse pardeamiento u oscurecimiento o cambio de color del medio, es mayor que en aquellos sistemas a los que no se les agrega, por ejemplo, bisulfito.

Durante el período de inhibición del PNE, una proporción del bisulfito ha comenzado a estar **irreversiblemente unido**. La relación entre las cantidades de bisulfito **libre**, de bisulfito **reversiblemente unido** y **total** (libre y reversiblemente unido) y el desarrollo de color se observa en la figura 17.

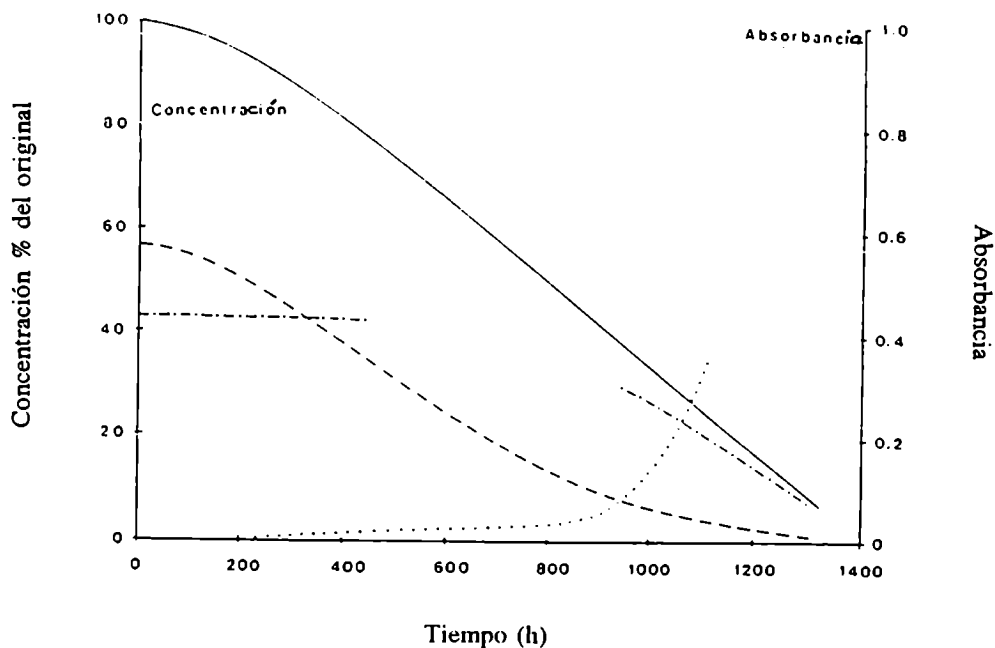


Fig. 17. Comportamiento de la relación concentración-tiempo del oxanión del S(IV) total, reversible e irreversiblemente unido durante la reacción inhibida de glucosa y glicina. También se observan los datos de absorbancia resultantes. Condiciones de reacción: [glucosa]=1M; [glicina]=0,5M; [S(IV)]=0,039M; pH 5,5; 55°C. Gráficos representados a partir de los datos publicados por McWeeny y col. (1969) para reproducir la figura mostrada por estos autores. S(IV) total, — ; S(IV) libre, - - - - ; S(IV) reversiblemente unido, - · - · - ; absorbancia a 490 nm, ···· (Wedzicha, 1984).

Estos datos de concentración fueron obtenidos por titulación con iodo y el desarrollo de color fue determinado por medición de la absorbancia a 490 nm de longitud de onda en sistemas conteniendo D-glucosa (1M), glicina (0,5M) y ión bisulfito (0,039M) a pH 5,5 y 55°C (Mc Weeny y col., 1969). En las primeras horas de tratamiento térmico (600 horas), la velocidad de pérdida irreversible de anión bisulfito sigue el perfil de decaimiento del aditivo **libre** presente en la solución, dado que el bisulfito **reversiblemente unido** permanece relativamente constante, no existiendo alteración del color. Si asumimos que la unión reversible del bisulfito es el resultado de la formación de los compuestos hidroxisulfonatos entre los grupos carbonilo activos y el aditivo, entonces la estabilidad de estos compuestos se incrementaría con el tiempo, o bien, a medida que se forman nuevos intermediarios con carbonilos activos, se formarán nuevos compuestos hidroxisulfonatos con mayor o menor constante de estabilidad según el compuesto. Estas constantes dependen del pH (Green and Hine, 1974).

Consecuentemente, la cantidad de bisulfito **libre** presente en la mezcla después de las 800 horas de tratamiento isotérmico, es pequeña. Al mismo tiempo se observa cómo las velocidades de pérdida del bisulfito reversiblemente unido y del bisulfito total se asemejan, lo que coincide con un aumento de absorbancia del sistema. Es razonable asumir que la combinación **irreversible** del bisulfito, es el resultado de las reacciones entre el aditivo **libre** y los intermediarios de la reacción de pardeamiento y que estas reacciones ocurren desde los primeros momentos del tratamiento. Estas son las que determinan la caída continua del bisulfito libre, mientras permanece constante la concentración de bisulfito reversiblemente unido. La cinética de orden cero observada para la pérdida del bisulfito, sugiere que la velocidad de formación del intermediario de la reacción de Maillard (en este caso) determina la velocidad de pérdida del aditivo y que, además, la reacción de formación del producto no disociado (o con bisulfito irreversiblemente unido) es rápida.



El comienzo del desarrollo de color coincide con el de descomposición de los hidroxisulfonatos, los cuales son todos lábiles, a un tiempo de reacción de 800 horas. Esta disociación sería, presumiblemente, una simple consecuencia de la disminución del bisulfito libre, la que determinaría (por acción de masas) el desplazamiento del equilibrio hacia la destrucción del hidroxisulfonato inicialmente formado. La consecuente liberación del compuesto carbonílico permitiría el desarrollo del pardeamiento.



Según estas observaciones y los resultados ilustrados en la figura 18 (Burton y col., 1962), el efecto de los oxoaniones de S(IV) es únicamente el de **demorar** la aparición del pardeamiento o el desarrollo de compuestos marrones o pardos.

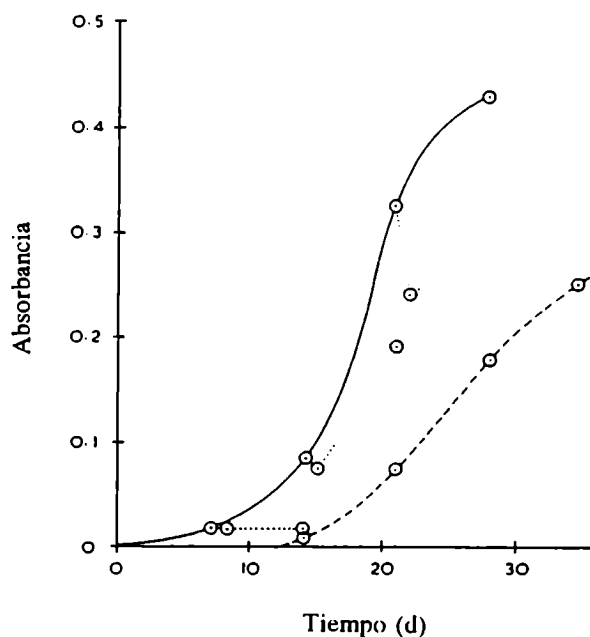


Fig. 18. Desarrollo de color en los sistemas modelo de glucosa-glicina, medido como absorbancia a 470 nm. Condiciones de reacción: [glucosa]=2,5M; [glicina]=1M; 50°C. Sin S(IV), —; mezcla de reacción conteniendo oxanión de S(IV) 0,031M, ----; efecto de la adición de S(IV) después que el pardeamiento haya procedido, ····. [S(IV)]=0,031M. Gráfico realizado a partir de los datos de Burton y col. (1962).

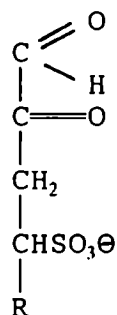
Una vez que el pardeamiento ha comenzado, éste procede a velocidad semejante tanto en aquellos sistemas que han sido sulfitados como en aquellos que no.

Cuando mezclas de glucosa y glicina sufren pardeamiento y a partir de aquí se les agrega bisulfito, se observa una casi instantánea reducción de la intensidad del color, aunque no llega a alcanzarse el mismo grado de absorbancia que, a igual tiempo, tiene el sistema que ha sido sulfitado desde un principio (figura 18). El color de las melanoidinas es parcialmente "blanqueado" por el bisulfito. Sin embargo, el subsecuente desarrollo de color en la muestra parcialmente "blanqueada", ocurre con velocidad semejante a la de la muestra sulfitada desde el inicio del tratamiento a temperatura constante. No se sabe si la reacción entre las melanoidinas y el aditivo origina combinaciones reversibles o irreversibles (Wedzicha, 1984).

Datos cinéticos para las reacciones de pardeamiento no enzimático derivadas de la degradación anaeróbica del AAs, tanto en presencia como en ausencia de bisulfito, se observan en la figura 19.

La mezcla de reacción es una solución de AAs (1M), glicina (0,5M) y donde el bisulfito fue agregado, se lo hizo a la concentración 0,05M. Las condiciones del medio fueron pH 3,5 y 40°C. **Cualquier pérdida de bisulfito** es el resultado de las combinaciones irreversibles con los intermediarios del PNE. Hay también formación de los hidroxisulfonatos lábiles. Al igual que en el caso de la reacción de Maillard, el bisulfito posterga el momento en que aparece el pardeamiento. En la reacción anaeróbica de pardeamiento por AAs (inhibida por bisulfito), la reacción que lleva a la pérdida del aditivo implica una reacción espontánea del AAs, determinante de la velocidad de reacción, seguida por la reacción de los intermediarios con el bisulfito. El efecto de "blanqueo" de las melanoidinas por agregado de bisulfito a un sistema que contiene AAs, libre del aditivo y ya pardeado, es particularmente destacable en este caso pero casi se llega a alcanzar la misma absorbancia (a un tiempo determinado) que el sistema





**3-desoxi-4-sulfo-D-hexulosa**  
I

Se observa la formación del compuesto I, con R=CHOH-CH<sub>2</sub>OH, en mezclas glucosa/glicina conteniendo bisulfito a pH 5,2, después de ser tratadas a 60°C.

Cuando se descompone AAs en presencia de bisulfito a 40°C y pH 3,0, el producto intermediario resultante tiene la estructura I, con R=CH<sub>2</sub>OH.

La 3-deoxi-sulosa que origina a la estructura I, es el paso obligado para el desarrollo de pigmentos pardos. La reacción del bisulfito con los intermediarios reactivos del pardeamiento es mucho más rápida que las reacciones de pardeamiento de dichos intermediarios.

**- Inhibición por bisulfito del PNE debido al ácido L-(+)-ascórbico**

a) En condiciones anaeróbicas.

A pesar de las diferencias entre las estructuras de la glucosa y del AAs, hay muchas semejanzas en los mecanismos por los cuales el PNE es inhibido en ambos sistemas. La principal semejanza radica en la participación de la 3-deoxi-sulosa (pentulosa o hexulosa) en ambas reacciones de pardeamiento. En ambos casos, el bisulfito tiene poco o ningún efecto sobre la reacción primaria pues este aditivo no se asocia con suficiente fuerza con los reactantes (glucosa o AAs) y porque además, en los sistemas modelo, las

concentraciones de glucosa y/o de AAs están generalmente en gran exceso respecto a la concentración del anión bisulfito.

El producto con AAs es la 3-deoxi-4-sulfopentulosa. Para obtenerlo, la única ruta posible sería la descarboxilación y deshidratación del AAs, seguido posteriormente por adición del oxoanión de S(IV) a la 3,4-dideoxi-3-ene-pentulosa.

b) En condiciones aeróbicas u oxidativas.

El efecto del bisulfito sobre el pardeamiento oxidativo del AAs es doble:

- el aditivo inhibe la autoxidación del AAs.
- el aditivo previene el subsecuente pardeamiento del ácido deshidroascórbico.

El primer efecto no es bien conocido pero podría implicar un mecanismo de radicales libres mediante el cual interrumpiría el paso previo a la conversión del AAs a DHA. Si el DHA llega a formarse, entonces el bisulfito reducirá con efectividad la reactividad de **sus carbonilos** a través de la formación del hidroxisulfonato correspondiente. Dada la rigidez de la estructura del DHA debida al anillo lactónico, sólo se conoce el monohidroxisulfonato, pues una vez formado éste, la reactividad del otro carbonilo disponible se ve disminuída por el impedimento estérico existente hacia la entrada del segundo nucleófilo.

La formación del monohidroxisulfonato del DHA reducirá la tendencia para la reacción con **aminas** y subsecuente desarrollo del pigmento rojo característico.

Se debe tener en cuenta la reacción del bisulfito con el DHA que es muy importante, pues este compuesto se "pardea" mucho más fácilmente que el AAs. La degradación del DHA incluye primero la apertura del anillo lactónico por hidrólisis irreversible para originar ácido 2,3-dicetogulónico. Este  $\beta$ -cetoácido sufrirá una fácil descarboxilación, produciéndose L-eritro pentosulosa (llamada comúnmente L-xilosona), que entra en el camino de formación de pigmentos marrones (Wedzicha, 1984).

### 1.1.1.m. Cinética de destrucción química de la vitamina C

La degradación química del ácido L-ascórbico está influenciada por muchos factores del medio donde se encuentra. Es por lo tanto necesario comprender la forma en que esto ocurre para llegar a conocer las condiciones de máxima retención de la vitamina durante el procesamiento y el almacenamiento de un determinado tipo de producto, de manera que la influencia resultante de la conjugación de todas las variables que intervengan en esto, sea óptima para la estabilidad.

Algunos de los factores críticos para la destrucción serían:

- temperatura
- pH
- oxígeno
- presencia de iones metálicos
- actividad de agua
- concentración y tipo de azúcares
- presencia de aminoácidos
- concentración y tipo de sales y ácidos
- luz
- enzimas
- material del envase y forma de envasado
- presencia de agentes oxidantes (nitrito, etc.)

La pérdida de ácido L-ascórbico en alimentos se produce en general, según una cinética de primer orden, por lo que depende de la concentración del mismo. Esto ocurre tanto en alimentos deshidratados como en aquéllos de mayor actividad de agua (Nagy y col., 1977; Lee y col., 1977; Kirk y col., 1977; Kincal y col., 1987; Pino y Penichet, 1981)

$$\frac{dC_A}{dt} = -k C_A \quad (2)$$

$k$  = cte. cinética de primer orden para la destrucción del AAs

$C_A$  = concentración de ácido L-ascórbico

$C_{A_0}$  = concentración de ácido L-ascórbico inicial

$t$  = tiempo

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} \frac{dC_A}{C_A} = - \int_0^t k \cdot dt$$

$$- \ln \frac{C_A}{C_{A_0}} = k \quad t$$

$$\ln \frac{C_A}{C_{A_0}} = - k \quad t$$

Se vio que esta relación cinética sólo sería válida en ausencia de oxígeno (anaerobiosis) y en abundancia del mismo (aerobiosis), es decir, con concentraciones de oxígeno no limitantes de la reacción (Dennison y Kirk, 1978).

La velocidad de degradación del AAs es por supuesto mucho mayor en presencia de oxígeno que en completa ausencia de él.

En muchas circunstancias prácticas, no ocurre ni lo uno ni lo otro, sino que el oxígeno está presente en cantidades limitadas y su concentración varía durante el almacenamiento del producto. Es así que en muchos trabajos publicados, se reporta una pérdida más rápida de la vitamina C al principio del almacenamiento, para luego continuar en forma más lenta y también respondiendo a una cinética de primer orden (Smoot y col., 1980; Nagy y col., 1977; Wartenberg, 1982). Esto fue observado en estudios de retención de ácido L-ascórbico efectuados en jugos de naranja y de toronja (grapefruit) envasados por el método tradicional de enlatado, en fórmulas para la alimentación infantil con alta  $a_w$ , en jugo de naranja reconstituído y almacenado a 4°C dentro de cajas de cartón laminado con plástico.

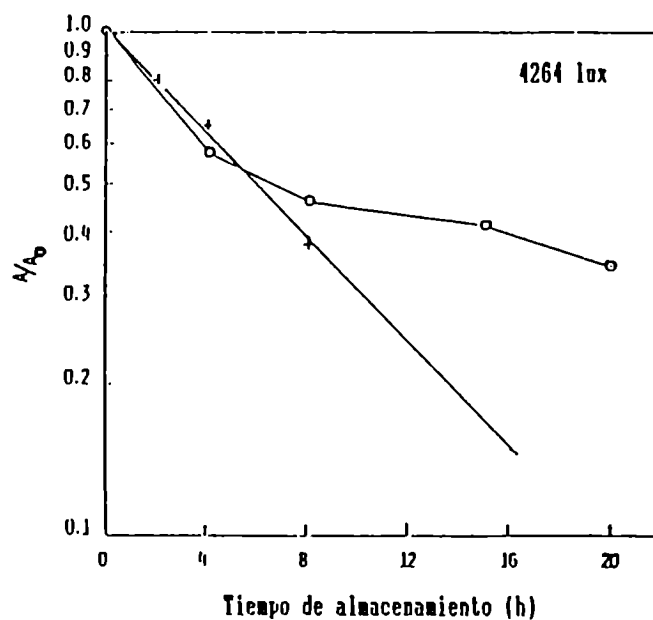


Fig.20. Influencia del contenido de oxígeno disuelto sobre la destrucción del AAs (+—+, oxígeno disuelto mantenido a una concentración de 8,71 ppm durante todo el almacenamiento; o—o, concentración inicial de oxígeno disuelto de 8,71 ppm seguido por la disminución del oxígeno disuelto hasta 0,2 ppm después de 20 horas) (Singh y col., 1976).

Otros autores observaron que con concentraciones de oxígeno disuelto limitantes, la pérdida de ácido L-ascórbico depende de su propia concentración y de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción (Lin y Agalloco, 1979; Singh y col., 1976).

$$\frac{dC_A}{dt} = -k C_A C_B \quad (3)$$

$C_B$  = concentración de oxígeno disuelto

Integrando esta ecuación, resulta:

$$\ln\left(\frac{C_A}{C_B}\right) = (C_{A0} - C_{B0}) k t + \ln\left(\frac{C_{A0}}{C_{B0}}\right)$$



donde:  $C_{A0}$  = concentración inicial de AAs  
 $C_{B0}$  = concentración inicial de oxígeno disuelto

La representación del  $\ln\left(\frac{C_A}{C_B}\right) = f(\text{tpo})$  da una recta (Fig. 22; Lin y Agalloco, 1979).

A partir de la ecuación (3) es fácil ver que con una concentración de oxígeno disuelto elevada o no limitante durante todo el almacenamiento, a una temperatura determinada, resulta que la  $C_B$  será constante y, en consecuencia:

$$\frac{dC_A}{dt} = -k \cdot C_B \cdot C_A$$

donde:  $k \cdot C_B = k'$

$$\frac{dC_A}{dt} = -k' \cdot C_A \quad (4)$$

Por lo tanto, en estas condiciones, la pérdida de ácido L-ascórbico cumpliría en realidad con una cinética de pseudo-primer orden (4), siendo  $k'$  la cte. de pseudo orden 1. En cambio, en condiciones anaeróbicas, tendría realmente una cinética de primer orden.

En todas las condiciones, la velocidad con que se pierde el ácido L-ascórbico aumenta conforme se eleva la temperatura de almacenamiento.

En soluciones acuosas de propilenglicol o de azúcares, Lin y Agalloco (1979) observaron que al aumentar la concentración inicial de ácido L-ascórbico, disminuye significativamente la velocidad de destrucción. Ellos encontraron, a su vez, la siguiente relación aproximada entre la cte. ( $k$ ) de primer orden y la concentración inicial, la cual es válida para concentraciones de ácido L-ascórbico entre 1 mg/ml y 100 mg/ml:

$$k = a \ln(C_{A0}) + b$$

donde a y b son función de la temperatura.

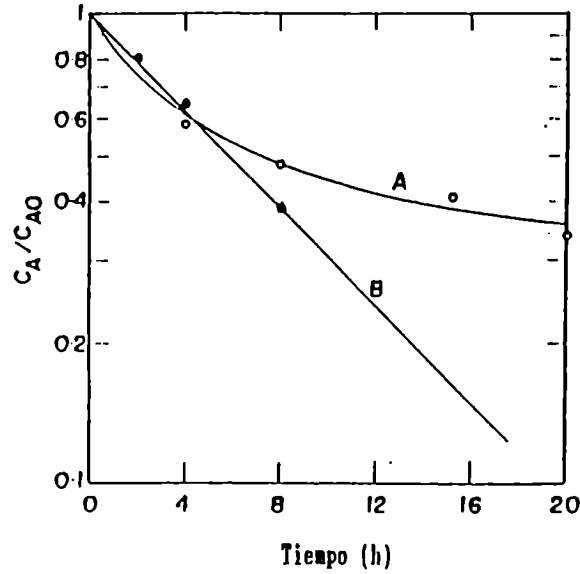


Fig. 21. La retención del AAs a:  
 A - Concentración inicial de oxígeno disuelto de 4,86 mg/l.  
 B - Concentración inicial de oxígeno disuelto de 8,71 mg/l  
 (Lin y Agalloco, 1979).

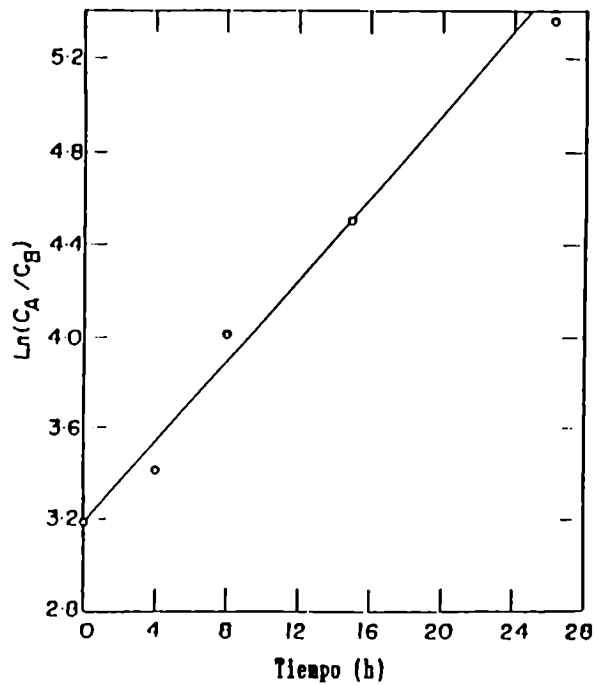


Fig. 22. Gráfico de  $\ln(C_A/C_B)$  vs. tiempo para la destrucción del AAs según una cinética de segundo orden a una concentración inicial de oxígeno de 4,86 mg/l (Lin y Agalloco, 1979).

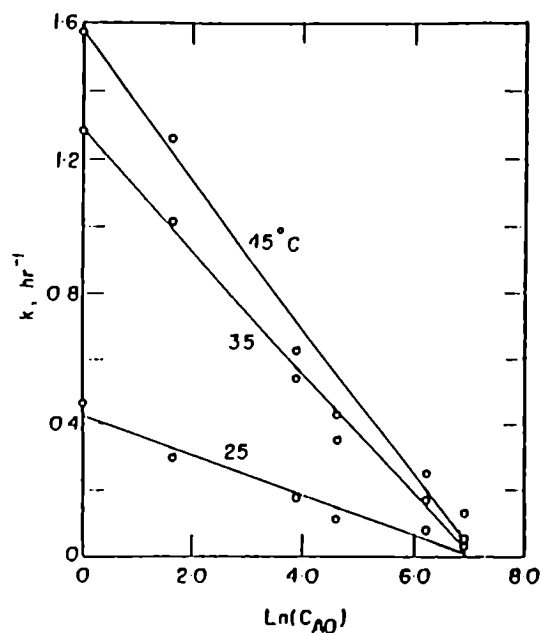


Fig. 23. Efecto de la concentración inicial de AAs sobre la velocidad de destrucción (Lin y Agalloco, 1979).

A continuación veremos en detalle el efecto de los distintos factores que afectan la destrucción del ácido L-ascórbico:

**Efecto de la temperatura:**

Tanto en condiciones de anaerobiosis como en presencia de oxígeno, así como en alimentos deshidratados y en jugos de fruta listos para el consumo, se vio que la constante de velocidad (k) correspondiente depende de la temperatura a través de la expresión de Arrhenius (Glasstone y Lewis, 1962):

$$k = A_0 e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

- donde: Ea = energía de activación (cal/mol)
- R = constante de los gases ideales = 1,987 cal/°Kmol
- T = temperatura absoluta (°K)
- A<sub>0</sub> = constante preexponencial

O sea que al representar gráficamente el log k en función de la inversa de la temperatura absoluta, se obtiene en todos los casos una recta.

Nagy y Smoot (1977) estudiaron la retención de vitamina C en jugo de naranja enlatado y almacenado durante doce semanas a temperaturas entre 4,4 y 48,9°C. Encontraron también que la relación entre la constante k y la temperatura obedece a la ecuación de Arrhenius, pero dentro de dos regiones de temperatura que se diferencian por tener distinta energía de activación (Ea). De esta manera, un jugo de naranja almacenado en las mismas condiciones y por encima de los 22 - 26,7°C, presenta una energía de activación mayor y, por lo tanto, un mayor efecto del incremento de la temperatura, que uno almacenado por debajo de ese punto crítico o zona de quiebre (Fig. 24, Nagy y Smoot, 1977).

Aunque la estabilidad del AAs aumenta al disminuir la temperatura del alimento, diversas investigaciones han señalado la posibilidad de que se produzca la pérdida acelerada por congelación, pero a temperaturas entre 0°C y -18°C, o durante el almacenamiento en frío (Tannenbaum, 1976).

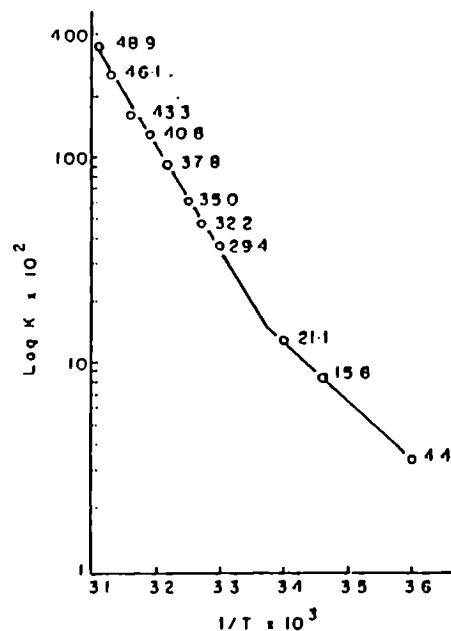


Fig. 24. Gráfico de Arrhenius de log K (mg de vitamina C perdida/100 ml de jugo por semana) vs. la recíproca de la temperatura absoluta de almacenamiento (Nagy y Smoot, 1977).

## Influencia del pH

Como ya se vio, el ácido L-ascórbico es, químicamente, un ácido diprótico débil y, por lo tanto, la composición relativa de las formas de ionización posibles ( $AH_2$ ,  $AH^-$  y  $A^-$ ) dependerá del pH del alimento. Se comprobó en la práctica que el pH (y por lo tanto esa composición relativa) afecta la velocidad de destrucción del ácido L-ascórbico. Lee y col. (1977) estudiaron la destrucción de la vitamina C en jugo de tomate como función de la temperatura de almacenamiento, pH y concentración de cobre, habiendo sido envasado en latas según el procedimiento general. El pH fue ajustado con buffer citrato a 3,53; 3,78; 4,06 y 4,36. Estos autores concluyeron que la cte. de destrucción del ácido L-ascórbico varía con el pH, presentando un máximo a 4,06, el que resulta aproximadamente igual al  $pK_{a1}$ , por ellos determinado ( $pK_{a1} = 4,087$  a  $37,8^\circ C$ ).

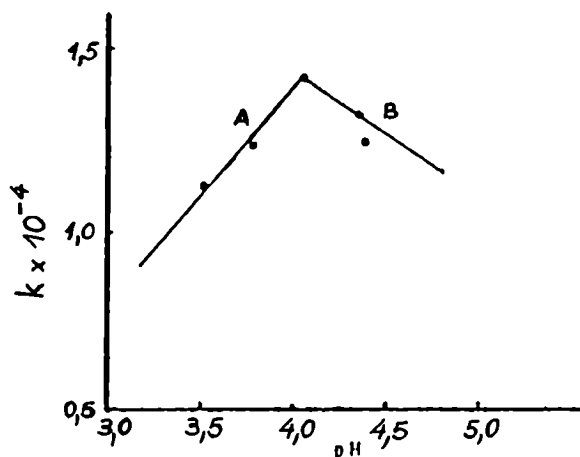


Fig. 25. Relación entre pH y la constante de velocidad a  $37,8^\circ C$  de la reacción de pseudo primer orden (Lee y col., 1977).

Establecieron entonces una ecuación para cada recta,

$$1) \quad \log k = 0,202 (\text{pH}) - 4,668 \quad (\text{A})$$

$$2) \quad \log k = -0,104 (\text{pH}) - 3,425 \quad (\text{B})$$

y además calcularon las energías de activación correspondientes a cada pH. Encontraron una relación lineal entre las energías de activación y el pH del medio:

$$\begin{aligned}
 a \quad \text{pH} < 4,06 & ; \quad E_a = -2,267 (\text{pH}) + 12,525 \\
 a \quad \text{pH} \geq 4,06 & ; \quad E_a = 1,840 (\text{pH}) - 4,178 \quad (5)
 \end{aligned}$$

Así, en condiciones anaeróbicas, la energía de activación para la destrucción del ácido L-ascórbico en jugo de tomate cambia con el pH, alcanzando un valor mínimo a  $\text{pH} = 4,06$  (cerca del  $\text{pK}_a$ ).

Posteriormente, Dennison y Kirk (1978) aplicaron la ecuación (5) para predecir la energía de activación de un sistema modelo deshidratado de  $\text{pH} 6,8$  obteniendo un valor de 8500 cal/mol, el cual correlacionó bien con los valores obtenidos en su estudio experimental.

Lin y Agalloco (1979) reportaron una dependencia lineal entre la  $E_a$  y el pH para las condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Fig. 26), las que son, respectivamente:

$$E_a = -1,3903 (\text{pH}) + 17,2464 \quad (6)$$

$$E_a = -0,2711 (\text{pH}) + 26,084 \quad (7)$$

La ecuación (6) sería válida entre  $\text{pH} 3$  y  $7$  (según los autores), mientras que la ecuación (7) lo sería a  $\text{pH} > 3$ , donde se cumpliría la linealidad.

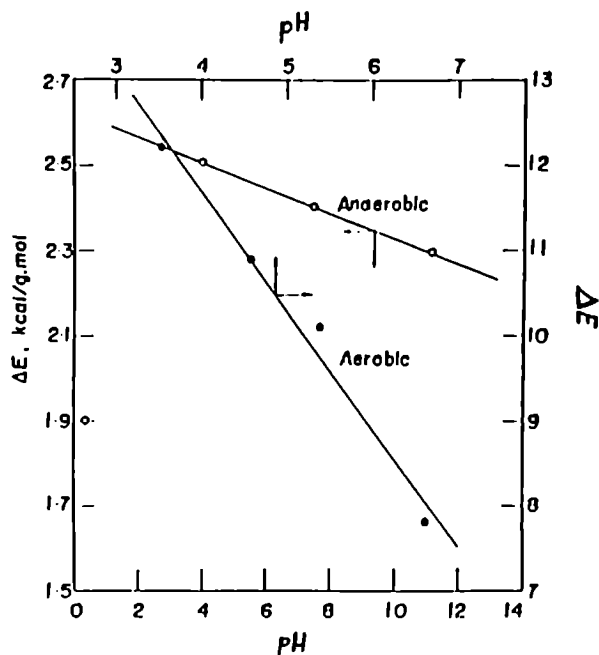


Fig. 26. El efecto del pH sobre la energía de activación en la constante de velocidad de destrucción del AAs (Lin y Agalloco, 1979).

Wanninger (1972) observó que el pH afecta las reacciones del ácido L-ascórbico y que probablemente cambiaría la energía de activación así como el factor o constante preexponencial ( $A_0$ ).

Autores como Huelin y col. (1971) han observado que la vitamina C es más estable en medio ácido ( $\text{pH} < 6$ ) y dentro de este intervalo de pH, se destruiría con cierta mayor facilidad cuando el pH es igual al  $\text{pK}_a$  del ácido L-ascórbico (Lee y col., 1977; Finholt, 1965b; Huelin, 1971).

Mikova y col. (1979) observó mayor destrucción del AAs en una fórmula para alimentación infantil, a  $\text{pH} = 4,6$  que a  $\text{pH} = 3,5$ .

Huelin (1953) estudió la retención de AAs en soluciones acuosas del mismo en un buffer citrato-fosfato y en atmósfera de nitrógeno (anaerobiosis) (Tabla 7). Observó que a  $30^\circ$ ,  $40^\circ$  y  $100^\circ\text{C}$  hay mayor velocidad de destrucción a pH entre 3,0 y 4,0, mientras que en soluciones azucaradas, el máximo ocurre a  $\text{pH} = 4,0$ . Asimismo determinó que, de todas maneras, a pH entre 2,2 y 6,0 la descomposición anaeróbica del AAs es una reacción extremadamente lenta comparada con la reacción con oxígeno (oxidativa) en iguales condiciones (Tabla 7).

**Tabla 7. Efecto del pH sobre la constante de velocidad ( $\text{min}^{-1}$ ) de destrucción del ácido ascórbico en soluciones acuosas de buffer citrato-fosfato (Huelin, 1953).**

pH	Cte.de velocidad para la descomp.anaeróbica			Cte.de velocidad para la oxidación a $40^\circ\text{C}$
	$30^\circ\text{C}$	$40^\circ\text{C}$	$100^\circ\text{C}$	
2,2	$8,3 \times 10^{-7}$	$21,6 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-4}$	$0,2 \times 10^{-2}$
3,0	9,8	27,1	3,9	1,2
4,0	8,9	26,8	5,8	5,3
5,0	3,6	11,2	2,9	14,4
6,0	1,8	5,9	1,9	25,1

Finholt y col. (1963) informaron que a  $\text{pH} 1,10$  en solución acuosa clorhídrica, la degradación anaeróbica del AAs tiene una cte. cinética de primer orden de  $0,323 \text{ horas}^{-1}$  a  $90^\circ\text{C}$  y una  $k = 0,801 \text{ hora}^{-1}$  a  $100^\circ\text{C}$ , dando un  $Q_{10} = 2,5$ . La

descomposición fue más rápida a pH 2,5 que a pH 6,0 y fue independiente de la concentración de ácido L-ascórbico.

Los mismos autores citados en el párrafo anterior, encontraron que el AAs se descompone en medio anaeróbico según una cinética de primer orden (96°C, solución acuosa con fuerza iónica 0,50 dada por cloruro de sodio). Ellos determinaron el perfil de destrucción del AAs por vía no-oxidativa, en función del pH, coincidiendo los valores calculados teóricamente en base a las reacciones descriptas más adelante, con los hallados experimentalmente, según:

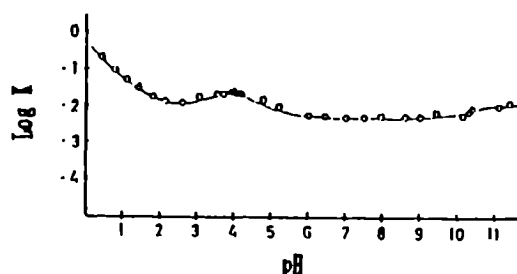


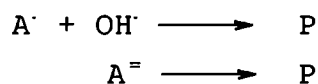
Fig. 27. Perfil de destrucción anaeróbica del AAs a 96°C, en función del pH. Los círculos representan los resultados experimentales; la línea corresponde a aquellos esperados teóricamente a partir de las seis reacciones propuestas (Finholt y col., 1963).

En la figura 27 se observa la degradación máxima a pH < 2, mientras que la velocidad va declinando ligeramente hasta pH 11, presentando un pequeño pico a pH 4 ( $pK_{a1} = 3,98$  en estas condiciones). Los autores sugirieron que este perfil está dado por las siguientes reacciones, las cuales ocurren simultáneamente, predominando unas sobre otras según el pH del medio de reacción:





De esta manera calcularon una  $k$  global a partir de la suma de las velocidades parciales, y llegaron a determinar una ecuación que permite calcular el valor de esa  $k$  global de degradación anaeróbica en función de la concentración de iones hidrógeno, de las constantes de disociación ácida del AAs y de las constantes de velocidad parciales de cada reacción posible. Postularon también la posible existencia de un complejo ( $\text{AH}_2 \cdot \text{AH}^-$ ) a determinado pH, como realmente ocurre con otros ácidos orgánicos y su anión correspondiente (ác. succínico, ác. benzoico, sacarina, etc.). La reacción (11) fue propuesta porque se observó que el tiempo de vida medio del AAs a pH 4 ( $\text{pH} = \text{pK}_{a1}$ ) es dependiente de la concentración de AAs total. La reacción (11) casi no tiene influencia en la forma del perfil calculado. Finholt y col. (1963) propusieron que a pHs entre 10 y 11,5 pueden ocurrir también otras reacciones que llevarían a la misma reacción  $\log k$ -pH:



Clegg (1964) determinó que el pardeamiento del jugo de limón (almacenado a 37°C durante 5 y 21 días) es máximo a pH 4,5 y mínimo a 2,2, que es el pH natural del jugo de

limón. Por lo tanto, según dicho investigador, la máxima retención de la vitamina se daría a  $\text{pH} < 4$ .

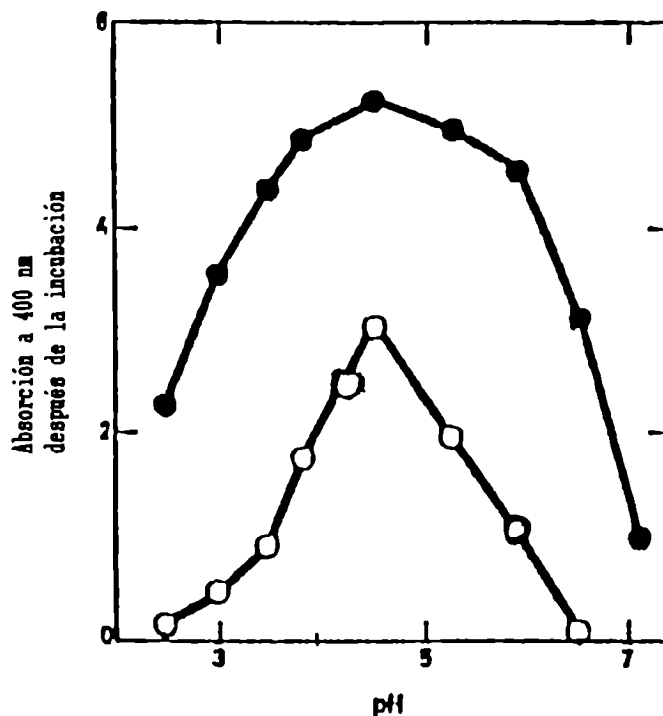
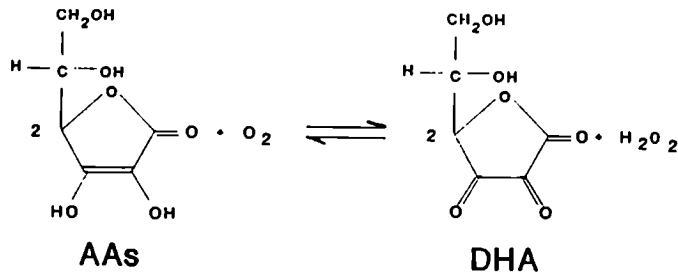


Fig. 28. Incremento de la absorción a 400 nm obtenido después que el jugo de limón ha sido ajustado a distintos pH y almacenado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 días (O) y 21 días (●) (Clegg, 1964).

### Influencia del oxígeno

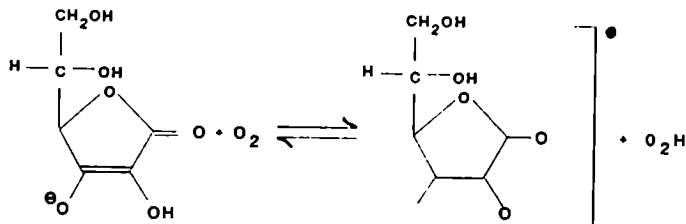
En presencia de oxígeno se produce la destrucción del ácido L-(+)-ascórbico por la vía aeróbica para dar ácido deshidroascórbico. Además sigue produciéndose paralelamente la descomposición por la vía no-oxidativa, pero ésta procede mucho más lentamente (Kurata y Sakurai, 1967a).

Así, el oxígeno molecular reacciona con el ácido por una reacción que es reversible:

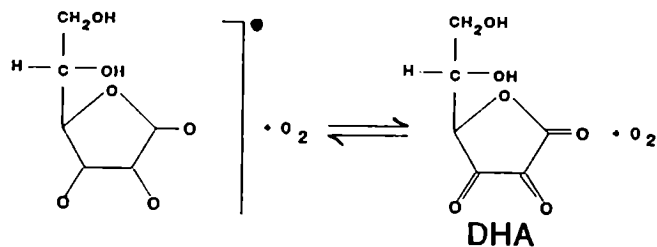


$$\begin{aligned}
 E_{\text{reducción}}^0 (\text{DHA/AA}) &= + 0,058 \text{ V (pH} = 7,0 ; 25^\circ\text{C} ; [\text{C}] = 1 \text{ M)} \\
 &= + 0,166 \text{ V (pH} = 4,0)
 \end{aligned}$$

En este proceso, el oxígeno molecular es el aceptor de dos electrones transferidos por el ácido L-ascórbico. Sin embargo, por transferencia de esos dos electrones de a uno por vez, se puede generar primero un radical libre intermedio que es el semideshidroascorbato radical:



$$E_{\text{reduc.}} (\text{A}^\bullet/\text{AAs}) = + 0,340 \text{ V}$$



Se han publicado muchos trabajos acerca de la destrucción aeróbica del ácido L-ascórbico en alimentos, y

en ellos se ha encontrado que aquélla procede según una cinética de segundo orden en presencia de cantidades de oxígeno limitantes, y según una cinética de pseudo primer orden cuando se mantiene la concentración de oxígeno saturante. En todos los casos, la constante de velocidad en estas condiciones son mayores que en anaerobiosis, por lo que el oxígeno es un componente negativo para la estabilidad del ácido L-ascórbico.

Ya la importancia del oxígeno en la autooxidación del AAs en soluciones acuosas de distintos azúcares, había sido destacada por distintos autores (Joslyn y Miller, 1949; Miller y Joslyn, 1949a). Khan y Martell (1967) determinaron que la oxidación de la vitamina sería proporcional a la concentración de oxígeno molecular hasta 0,2 atm de presión. El monoanión del AAs resulta ser especialmente reactivo a  $\text{pH} \leq 7$ . El mecanismo propuesto sugiere la directa participación del oxígeno molecular en la oxidación espontánea del anión. En el mismo trabajo, Khan y Martell demostraron que la velocidad de oxidación del AAs catalizada por iones férrico ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) y cúprico ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) es de primer orden con respecto al oxígeno molecular.

Ford (1967) y Burton y col. (1970) han informado que la estabilidad de la vitamina C en leche está determinada por la concentración de oxígeno residual presente en dicho producto.

Las constantes de velocidad de segundo orden para la destrucción del AAs aumentan, conforme la concentración inicial de oxígeno disuelto lo hace, de 4,86 a 8,71 ppm, siendo esta última la concentración de oxígeno saturante en un medio acuoso (Singh, 1976), a una temperatura de 7,2°C.

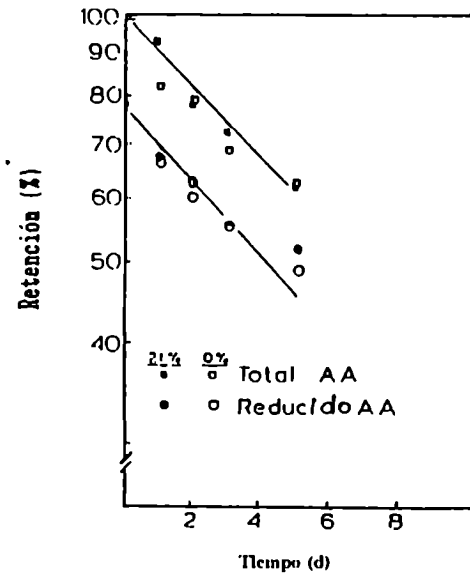
Se ha demostrado, a su vez, que la velocidad de oxidación del ácido por el oxígeno varía con la actividad de agua del alimento, para una determinada temperatura e igual contenido de oxígeno en el envase contenedor. Dennison y Kirk (1978), Kirk y col. (1977) y Riemer y Karel (1978), observaron tal cosa en sistemas modelo emulando alimentos a base de cereales y en jugo de tomate deshidratado, respectivamente.

Waletzko y Labuza (1976) destacaron la mayor estabilidad del ácido L-ascórbico en un alimento con  $a_w$  0,85 en atmósfera libre de oxígeno, comparado con el mismo sistema almacenado en presencia de oxígeno. Además, la diferencia en la inestabilidad del ácido L-ascórbico entre los dos sistemas disminuyó significativamente al aumentar la temperatura desde 25° hasta 45°C.

En muchos de los trabajos enunciados previamente se determinó cuantitativamente no sólo el ácido L-ascórbico disponible (AAs reducido) sino también el contenido de ácido deshidroascórbico, para así conocer el contenido de AAs total.

En general, en ellos se pudo determinar que el oxígeno disuelto en el agua del alimento sería el responsable de la oxidación y, por lo tanto, conforme disminuye la cantidad de agua disponible ( $a_w$ ) en el alimento, disminuye también la velocidad de oxidación del ácido L-ascórbico. Además, la disminución de la  $a_w$  implica el consecuente incremento en la concentración de sólidos solubles, lo que provoca la disminución de la solubilidad del oxígeno (Joslyn y Supplee, 1949). En consecuencia quizás ocurra que a actividades de agua muy bajas (0,10 o menos, si fuera posible) sólo proceda el mecanismo anaeróbico de destrucción del ácido L-ascórbico (Kirk, 1981). A tan baja actividad de agua, también se vería dificultada la destrucción anaeróbica pues, teóricamente, no existiría movilización de solutos reactivos.

Riemer y Karel (1978) observaron en jugo de tomate deshidratado, que el efecto del oxígeno es insignificante, tanto para la retención del ácido L-ascórbico como para el AAs total (Acido ascórbico y Acido deshidroascórbico), a actividad de agua de 0,32 y 37°C de temperatura. Ello se observa en el siguiente gráfico:



21% y 0% = oxígeno en el espacio de cabeza

Fig. 29. Retención de AAs total y reducido en jugo de tomate deshidratado almacenado, de actividad de agua 0,32 y a una temperatura de 37°C (Riemer y Karel, 1978).

Los resultados demostrarían en general que es importante determinar el contenido de oxígeno disuelto o retenido en un alimento de elevada actividad de agua, ya que ello condicionaría la cinética de destrucción del AAs (reducido y total).

Mohr (1980) destacó este hecho al afirmar la importancia de los **efectos de transferencia de masa** del oxígeno en la predicción de la destrucción aeróbica del AAs. El oxígeno de la atmósfera dentro del envase, primero debe disolverse en la interfase gas-alimento (**solubilidad**) y a continuación el oxígeno debe **difundir** hacia el interior del alimento.

En cuanto a la solubilidad del oxígeno en el alimento, si la consideramos (muy generosamente) igual a la solubilidad del O<sub>2</sub> en el **agua pura**, entonces puede demostrarse que el número de moles de oxígeno disuelto en el alimento en un instante dado cualquiera, es menor que 0,01 veces el número de moles de AAs que reaccionan durante cualquier experimento (Perry y Chilton, 1973).

La solubilidad del oxígeno en la interfase del alimento disminuye al aumentar la temperatura y al aumentar la actividad de agua (entre 0,69 y 0,90), por lo tanto aumenta la velocidad de transferencia de oxígeno al alimento y aumenta, entonces, la velocidad de oxidación del ácido L-ascórbico, lo que confirmaría lo observado en las diversas investigaciones.

### **Efecto de los metales**

Los iones de los elementos de transición en general, catalizan la oxidación del ácido L-ascórbico por el oxígeno, a ácido DHA. Ello se debe a que forman un complejo de coordinación con el monoanión ascorbato (Bauernfeind y Pinkert, 1970).

De esta manera, se está facilitando la reacción entre el ascórbico y el oxígeno y por lo tanto aumenta la velocidad con que se alcanza el equilibrio. La catálisis por iones de metales de transición da origen al radical libre semideshidroascorbato como intermediario, el cual vuelve a ceder un electrón al oxígeno para transformarse en DHA. Consecuentemente se genera peróxido de hidrógeno y radicales libres superóxido, por lo que resulta peligrosa la destrucción que procede en esta forma. El radical semideshidroascorbato **no** es particularmente reactivo y sufre así principalmente una reacción de dismutación:



La acción catalítica de los metales de transición se debe a su valencia variable y a su característica distribución electrónica (Halliwell and Gutteridge, 1989), como se mencionó previamente. La secuencia de reacciones se ve en el siguiente esquema:





Son particularmente aceleradores para la destrucción del ascorbato el  $\text{Fe}^{\text{III}}$  y el  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , siendo el último especialmente activo. Dennison y col. (1978) estudiaron la influencia de la fortificación mineral sobre la estabilidad del AAs reducido y total (AAs + DHA) en alimentos almacenados a  $30^{\circ}\text{C}$ , en presencia de oxígeno y con distintas  $a_w$ . A  $a_w$  muy bajas (0,10) ningún metal afecta la destrucción del AAs reducido ni total, lo que es lógico dado que la no disponibilidad de agua impediría la solubilización y movilización de los iones. A  $a_w$  de 0,40 sólo las sales solubles de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  aceleran ligeramente la destrucción de la vitamina C mientras que a actividades de agua mayores (0,65 o más) todos los iones ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) disminuyen dramáticamente la retención de la sustancia.

Las sales **solubles** en agua de aquellos iones son las que actúan activamente, al liberar al ión en cuestión en la concentración necesaria.

Khan y Martell (1967) han reportado que la velocidad de oxidación del AAs catalizada por iones  $\text{Cu}^{\text{II}}$  es de primer orden con respecto a la concentración del oxígeno molecular y que la velocidad muestra una dependencia inversa con respecto a la concentración de iones hidrógeno.

Weissberger y Lu Valle (1944) investigaron la autooxidación de soluciones 0,008 M de ácido L-ascórbico a pH entre 2,6 y 9,3 en la presencia de nitrato de cobre (II), el que fue agregado en concentraciones entre  $4 \times 10^{-6}$  a  $200 \times 10^{-6}$  moles/litro. Ellos encontraron que a las concentraciones más bajas señaladas, la velocidad de autooxidación de la vitamina aumenta más rápido que lo que va en aumento la concentración de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , pero a las más altas concentraciones, el aumento de dicha velocidad es proporcional al incremento de la concentración de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Los autores propusieron que sólo el monoanión del ascorbato es susceptible a la catálisis por el ión  $\text{Cu}(\text{II})$ . Joslyn y Miller (1949) determinaron que una concentración de  $\text{Cu}(\text{II})$  de  $2 \times 10^{-5}$  Molar aumenta la velocidad de oxidación del monoanión en un factor de  $10^4$ .

Joslyn y Miller (1949) estudiaron la catálisis de la oxidación del AAs en soluciones reguladas por diferentes buffers y a diferentes pHs, a través de las cuales hacían burbujear continuamente oxígeno a una velocidad de 100 ml/min, lo que implicaba que la disponibilidad de oxígeno no era un factor limitante. Encontraron así que la reacción de oxidación es de primer orden con respecto a las concentraciones de AAs y su velocidad es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de Cu(II) e inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de iones hidrógeno, en solución ácida. Los iones férrico catalizaron la oxidación del AAs en las soluciones más ácidas, pero muy ligeramente en comparación con el Cu<sup>II</sup>. A pH cercanos a la neutralidad, los iones férrico parece incluso inhibir la oxidación catalizada por el cúprico. La oxidación del AAs es afectada por el pH y la composición del buffer. Aquellos aniones constituyentes del buffer capaces de complejar a los iones de los metales de transición, al mismo nivel de pH, inhiben el efecto catalítico. Hsieh y Harris (1987) comprobaron el efecto complejante del acetato, anión del buffer correspondiente, sobre el Cu(II), disminuyendo la concentración de metal activo.

En ausencia del oxígeno (anaerobiosis), los iones metálicos no tendrían efecto sobre la velocidad de descomposición no-oxidativa del ácido L-ascórbico (Tannenbaum, 1976). Sin embargo Lee y col. (1977) encontraron que la velocidad de destrucción anaeróbica aumenta al elevarse la concentración del ión en el jugo de tomate desaereado y enlatado según los procedimientos conocidos. Es también dependiente del pH, con un máximo a pH 4,06 (pK<sub>a1</sub> en esas condiciones). Pero por otro lado, Lamb (1946) observó en su trabajo de investigación que en los jugos cítricos frescos, el AAs exhibe notable estabilidad bajo condiciones que en otros casos promoverían su rápida destrucción. El observó en jugo de naranja y de toronja enlatado (previo desaereado) una retención entre el 91,6 y 107,5% con respecto

al contenido inicial de la vitamina, luego del procesamiento, y una velocidad de pérdida del 1%/mes en 18 meses de almacenamiento. O sea que, si bien existen juntas con cobre en válvulas, cañerías, etc., por donde circula el alimento antes de su envasado, el efecto de los metales eventualmente presentes no se observó en la velocidad de pérdida del AAs.

### Influencia de la actividad de agua

La actividad de agua ( $a_w$ ) es un factor determinante en el tema analizado pues es el contenido de agua **disponible** en el alimento. Ella condiciona las reacciones químicas que en él puedan ocurrir, su comportamiento físico-químico y su estabilidad microbiológica. Les da **movilidad** a los componentes del alimento, afectando así la velocidad de reacción. A través del procesamiento y también del almacenamiento, se producen cambios en el alimento, los cuales afectarán el agua disponible. La velocidad de reacción para la descomposición del ácido L-ascórbico (no oxidativa y oxidativa) aumenta con la  $a_w$ . Así lo han corroborado diversos autores.

Riemer y Karel (1978) determinaron la velocidad de destrucción del AAs en función de la temperatura y de la actividad de agua para un jugo de tomate deshidratado por liofilización. Representando gráficamente los valores por ellos obtenidos (Tabla 1, pág. 302) resultan las curvas de la Figura 31, para actividades de agua bajas e intermedias (0,10 a 0,75). Lee y Labuza (1975) obtienen un gráfico semejante para un sistema modelo de humedad intermedia (Figura 32).

Riemer y Karel determinaron que la destrucción del AAs procede por una cinética de primer orden y las constantes correspondientes dependen de la temperatura según la expresión de Arrhenius, para una  $a_w$  determinada:

$$k = A_0 e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

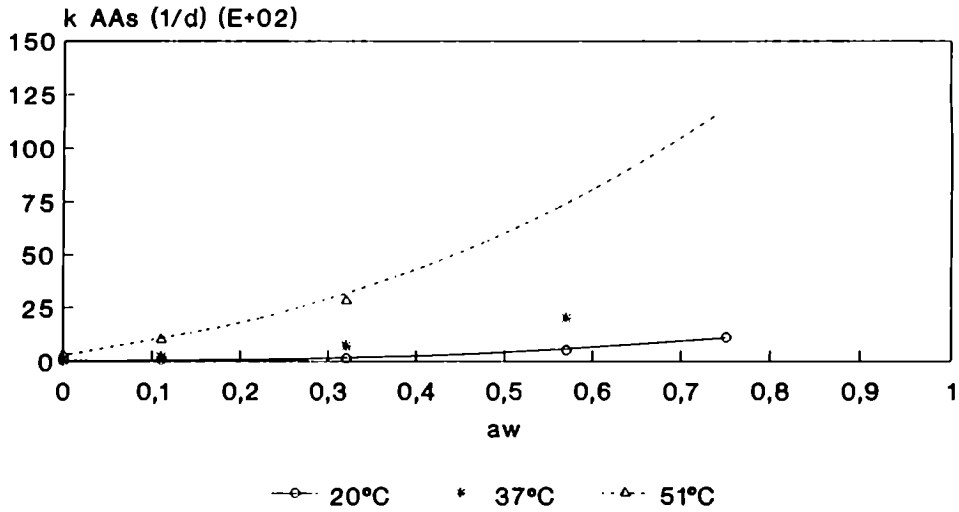


Fig. 31. Velocidad de destrucción del AAs vs.  $a_w$  a temperatura constante para jugo de tomate deshidratado por liofilización (Riemer y Karel, 1978).

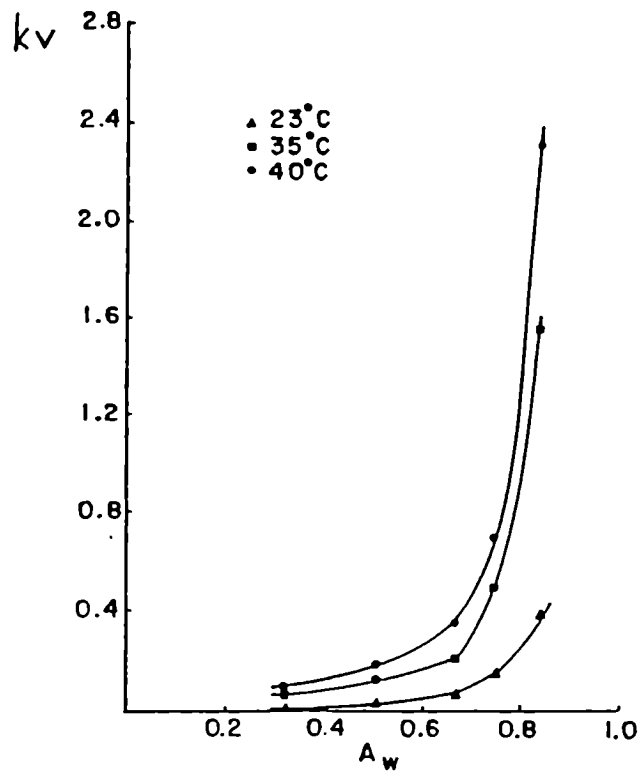


Fig. 32. Velocidad de destrucción del AAs vs.  $a_w$  a temperatura constante para un sistema modelo alimenticio de humedad intermedia (Lee y Labuza, 1975).

A su vez observaron que la energía de activación disminuye linealmente al aumentar la  $a_w$  entre 0,10 y 0,75. De igual manera varía el factor preexponencial  $A_0$  (días<sup>-1</sup>) con la  $a_w$ . Así determinaron las siguientes relaciones matemáticas:

$$k_0 = 10^{10} \cdot e^{(\alpha \cdot \beta \cdot a_w)}$$

$$E_a = e^{(\gamma \cdot \delta \cdot a_w)}$$

Evaluando estas ecuaciones frente a cien sistemas experimentales, hallaron el valor de cada parámetro:  $\alpha = 8,100$ ;  $\beta = 8,969$ ;  $\gamma = 9,999$  y  $\delta = 0,470$  con un buen ajuste total.

Para la destrucción del AAs y de la vitamina C en alimentos deshidratados, en presencia de cantidad limitada de oxígeno y de exceso de oxígeno, Blackadder y Hinshelwood determinaron las energías de activación y luego la energía libre según:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$$

Así se comprobó que  $\Delta S^\ddagger$  y  $\Delta H^\ddagger$  variaban con la actividad de agua en todas las condiciones de manera que  $\Delta G^\ddagger$  permanecía aproximadamente constante (26,29 Kcal/mol). Esto indicaría que las reacciones de destrucción del AAs de la vitamina C (AAs + DHA) en el sistema modelo con determinado contenido de oxígeno, siguen el mismo mecanismo para las distintas actividades de agua. Además, se determinó que la reacción es controlada por la entropía de activación ( $\Delta S^\ddagger$ ). La velocidad de reacción aumenta al aumentar la  $a_w$  ya que aumenta la movilidad con el aumento de agua disponible (efecto del solvente). Ello también puede ser debido a la disminución de la carga efectiva del complejo de transición (Kirk, 1981).

El efecto del oxígeno sobre la pérdida de AAs aumenta dramáticamente a actividades de agua mayores de 0,65: Al aumentar la disponibilidad del solvente, aumenta la transferencia de masa del oxígeno, como fuera destacado por Mohr (1980).

## Influencia de la concentración y tipo de azúcares

Los estudios de la destrucción oxidativa del AAs conciernen principalmente a la pérdida de la vitamina durante la preparación de alimentos procesados. En alimentos enlatados, no obstante, el oxígeno está presente en cantidades restringidas al principio, procediendo la ruta oxidativa de destrucción durante el procesamiento y los primeros días de almacenamiento. El AAs se degrada rápidamente hasta que se agota el oxígeno. Luego procede la destrucción no oxidativa solamente (Huelin, 1953).

Huelin, trabajando con un buffer citrato-fosfato de pH 2,2 a 6,0, observó una mayor velocidad de descomposición anaeróbica del ácido L-ascórbico entre pHs 3 y 4, siendo acelerada por la fructosa, fructosa-6-fosfato y fructosa-1,6-difosfato. Este efecto aumenta con el pH a 100°C y sólo hasta pH 4,0 a 30°C. El efecto acelerador de la sacarosa aparece sólo a  $\text{pH} \leq 4,0$ , tanto a 30°C como a 100°C, debiéndose esto a la hidrólisis de la sacarosa y consecuente acción de la fructosa originada. A alta temperatura y acidez, el furfural y el  $\text{CO}_2$  son los principales productos.

Miller y Joslyn (1949) determinaron las velocidades de oxidación del AAs con concentraciones limitantes y excesivas de oxígeno, a varios pH y con diferentes azúcares en concentraciones del 20% y 40%, en presencia de  $\text{Cu(II)}$  y  $\text{Fe(III)}$ . En estas condiciones, la protección ejercida por los azúcares aumenta con la concentración de los mismos y con el aumento del pH. El orden decreciente de protección es: levulosa (fructosa), maltosa, sacarosa y dextrosa (glucosa). La velocidad de oxidación en presencia de azúcares sería esencialmente de primer orden respecto de la concentración de oxígeno. El  $\text{Cu(II)}$  catalizó la oxidación en todos los pH analizados, en cambio el  $\text{Fe(III)}$  sólo lo hizo a pH ácido hasta no más de 4,0. A pH mayores, el  $\text{Fe(III)}$  resultó un inhibidor de la oxidación del ácido L-(+)-ascórbico. En realidad, a  $\text{pH} > 4,0$  ya disminuye mucho la solubilidad del  $\text{Fe(III)}$ , pues aparece su coordinación con tres iones

hidróxidos. El mecanismo de protección de los azúcares es debido, probablemente, a la formación de complejos entre el azúcar y el Cu(II). Pero los azúcares usados, en concentración de hasta 40%, suprimen el poder catalítico de una cantidad equivalente de Cu(II) de 1 ppm.

Según los autores, Michaelis y Rona (1913) informaron las constantes de disociación ácida de azúcares a 18°C:

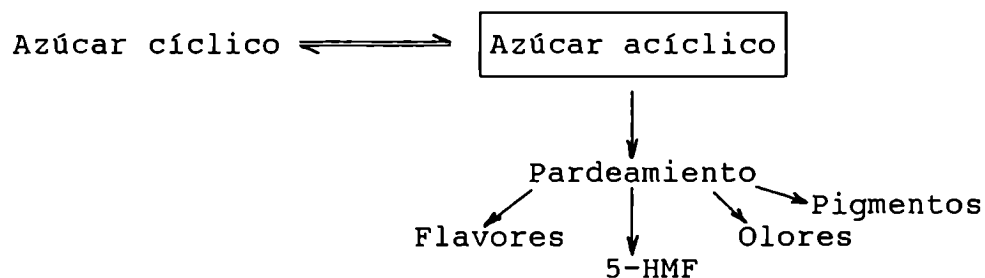
Sacarosa	$2,4 \times 10^{-12}$	
Maltosa	$1,8 \times 10^{-12}$	
Manosa	$1,1 \times 10^{-12}$	
Fructosa	$9,0 \times 10^{-13}$	
Glucosa	$6,6 \times 10^{-13}$	
Lactosa	$6,1 \times 10^{-13}$	
Galactosa	$5,2 \times 10^{-13}$	
Sorbitol (poliol)	$2,5 \times 10^{-14}$	("The Merck Index")

La facilidad con que formen el anión libre determinaría la facilidad con que complejarían a los iones de los metales de transición. Evidentemente estos datos no justifican el orden de protección dado por Miller y Joslyn (1949) y requieren de otras hipótesis para justificar los resultados observados. Estos autores confirmaron posteriormente que la velocidad de oxidación del AAs en presencia de 0,50 ppm de Cu(II) y 10 ppm de Fe(III) es mínima a pH entre 2,0 y 3,0 y aumenta con el pH hasta que éste llega a 7,5. También aumenta considerablemente a medida que disminuye la concentración del azúcar presente en la solución. La fructosa resulta nuevamente más protectora que la dextrosa y sacarosa.

Joslyn y Supplee (1949) estudiaron la influencia de los azúcares sobre la velocidad de transformación del ácido deshidroascórbico en ácido 2,3-dicetogulónico. La cinética de esta reacción fue determinada como de orden uno por debajo de pH 4,0 y se acelera por el incremento de la temperatura y del pH. Los autores encontraron que la glucosa inhibe esta descomposición y esta protección aumenta con la concentración.

Con un 40% p/p de concentración en agua (pH = 5; 28,2°C), el orden descendente de protección fue: dextrosa, maltosa, sacarosa, lactosa. La fructosa al 20% p/p de concentración no tuvo efecto protector.

Se debe tener en cuenta que el aumento en la concentración de azúcares produce, además de la disminución de la actividad de agua, el aumento de la viscosidad y por lo tanto, disminuye la solubilidad y la facilidad de difusión de reactivos como el oxígeno. Esto debe también contribuir a la acción protectora de los azúcares. De todas maneras se debe tener en cuenta que son sustancias reactivas, capaces de producir el pardeamiento no enzimático del alimento, especialmente durante el almacenamiento. Esta reactividad está condicionada por el pH, temperatura y presencia de aminoácidos. Los azúcares son tanto más reactivos cuanto más fácilmente pasan a la forma acíclica, necesaria para la posterior serie de reacciones que llevarán al pardeamiento.



El pardeamiento no enzimático es particularmente importante a actividades de agua mayores de 0,65. En el caso de la fructosa hay un equilibrio entre las formas cíclicas furanósica y piranósica, siendo la primera más inestable y su proporción (al igual que la de la forma acíclica) aumenta con la temperatura. Mathews y Jackson (1933) determinaron que la máxima estabilidad de la fructosa (cíclica) ocurre a pH 3,5 siendo inestable en medio fuertemente ácido y en medio alcalino (pH > 8, según la temperatura). Asimismo, la glucosa sufre mínima degradación a pH entre 2,5 y 4,0 según lo determinaron Singh y col. (1948) a través de la



cuantificación de 5-hidroximetilfurfural. Buera y col. (1987) determinaron la velocidad de hidrólisis de la sacarosa con una cinética de orden uno ( $a_w = 0,90$ ;  $55^\circ\text{C}$ ) y observaron la mayor velocidad a pH más ácidos (Fig. 33). La hidrólisis de la sacarosa implica la formación de fructosa y glucosa, lo que determina su actividad en el pardeamiento, pues el disacárido original es no reductor y, por consiguiente, estable en este tipo de reacciones, al no tener un grupo carbonilo disponible.

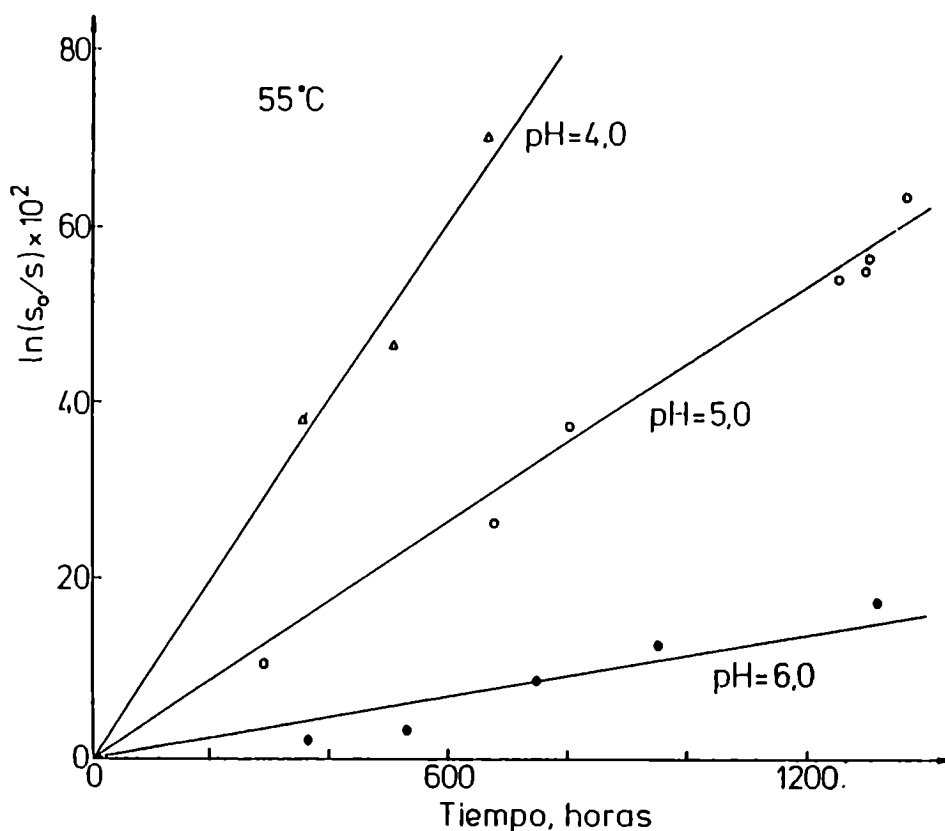


Fig. 33. Representación de la cinética de orden uno para la hidrólisis de sacarosa en muestras de  $a_w = 0,90$  y de diferentes valores de pH tratadas a  $55^\circ\text{C}$ . S = índice de saturación (Buera, 1987).

#### - Influencia de la presencia de aminoácidos

Los aminoácidos en general son particularmente activos, tanto frente a los azúcares como frente al ácido L-ascórbico. Con los primeros, dan lugar a la reacción de Maillard y con



AAs produce el pardeamiento en el jugo de naranja pero el grado de la oxidación requerida para ello depende de las condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, cuanto mayor es la temperatura, el pardeamiento ya aparece con sólo un 10% de pérdida del ácido L-ascórbico por oxidación.

Joslyn (1956) estudió el papel que desempeñaban los aminoácidos en el pardeamiento no enzimático derivado de la descomposición **oxidativa** del ácido ascórbico. El autor concluyó que el ácido L-ascórbico es muy activo en el oscurecimiento por oxidación, mucho más que el ácido dehidroascórbico, el que también fue evaluado. Todos los aminoácidos ensayados (alanina, asparagina, glicina y lisina) aumentaron el desarrollo de color (a 40°C) en mezcla con el AAs. Sólo el **ácido glutámico** produjo disminución considerable del pardeamiento por descomposición oxidativa del AAs, especialmente durante los primeros 11 días del almacenamiento. El agregado de glucosa a la mezcla de AAs con cada aminoácido demora notablemente el deterioro por oscurecimiento en todo el tiempo que dura el almacenamiento y en particular, en la mezcla con ácido glutámico.

Mikova y col. (1979) observaron posteriormente que la presencia de ácido glutámico en sistemas modelo y en una fórmula de alimento infantil a base de manzana, aumenta la retención del ácido L-ascórbico, más a pH = 3,5 que a pH = 4,6, habiendo hecho el almacenamiento a 20°C. A su vez comprobaron que el ácido glutámico reduce notablemente el efecto catalítico del cobre (II) en la oxidación de AAs.

Nafisi y Markakis (1983) demostraron un efecto inhibitorio del ácido glutámico y del ácido aspártico, sobre el desarrollo de pardeamiento en mezclas de glucosa-lisina (a 60°C y pH 8,0).

Joslyn (1956) comprobó el mismo efecto visto sobre el ácido L-ascórbico, en el DHA. En este caso, tanto la glucosa como la fructosa retardaron muy considerablemente el desarrollo de color, excepto en la mezcla DHA y fructosa y lisina. En todos los casos por él estudiados, se observó la mayor reactividad del AAs que del DHA.

Seaver y Kertesz (1946) estudiaron el pardeamiento no enzimático en soluciones acuosas de diversa composición, a 98°C y pH 4,3 en tubos cerrados. El desarrollo de color por la descomposición del ácido L-ascórbico en la solución fue aumentado por el agregado de glicina, observando una particular disminución del pardeamiento sólo en la 2ª hora de calentamiento. Comprobaron además que el AAs forma compuestos coloreados, derivados de su descomposición, más fácilmente que los azúcares comunes, aunque fue menos activo en ello que los ácidos urónicos (galacturónico, glucurónico).

Reyes y col. (1982) determinaron la reactividad relativa de mezclas de glucosa-glicina, fructosa-glicina y sacarosa-glicina a pH 3,5 y 60°C. La sacarosa en estas condiciones, se hidrolizó y desarrolló pardeamiento en grado semejante a la glucosa. La fructosa, luego de un primer momento de almacenamiento, es menos reactiva en la reacción de Maillard. Esto es porque la imina intermediaria formada a partir de la fructosa es menos reactiva en el posterior pardeamiento, por ser más estable (Fig. 34).

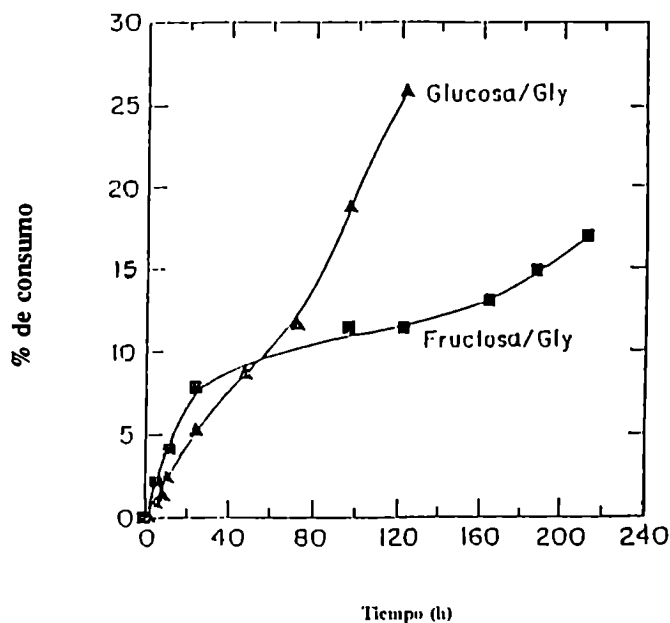


Fig. 34. Consumo de glucosa y fructosa en sistemas glucosa-glicina y fructosa-glicina durante el almacenamiento a 60,0°C y pH 3,5 (% consumido representa el % de azúcar perdida) (Reyes y col., 1982).

Con baja disponibilidad de oxígeno, el efecto de los aminoácidos sobre el pardeamiento por AAs es mucho menor, porque ya de por sí, la vitamina es más estable.

#### **Influencia de los ácidos y de la composición de los buffers usados para ajustar el pH**

Finholt y col. (1963) determinaron el efecto catalítico que ejercían los componentes del buffer usado en la destrucción anaeróbica del AAs. Para ello analizaron cómo se modificaba la cte. de velocidad de descomposición no-oxidativa, a un pH constante pero regulado por distintos buffers. Así encontraron que los fosfatos aumentan la velocidad de destrucción de la vitamina a  $\text{pH} < 6,0$ , mientras que casi no tendría efecto entre  $\text{pH} 6,00$  y  $7,50$ . Esto estaría relacionado con la composición aniónica del buffer fosfato, la cual está determinada por el pH.

El buffer oxalato tiene mucho menos efecto acelerador que el anterior, y lo presenta a pH entre  $3,70$  y  $4,10$ . Lo mismo ocurre con el buffer acetato entre  $\text{pH} 4,02$  y  $5,20$ . En cambio el buffer borato acelera considerablemente la velocidad de destrucción a los pHs entre  $7,95$  y  $8,57$ .

Seavre y Kertesz (1946) ya habían observado el aumento del pardeamiento por el agregado de fosfato.

Lamden y Harris (1949) observaron el efecto acelerador del pardeamiento de soluciones de AAs por el agregado de ácido cítrico, efecto que aumentaba con la acidez del medio. Ya la mezcla de las drogas sólidas conteniendo agua de cristalización desencadenaba la descomposición. Así se explicaría la mayor tendencia al pardeamiento no enzimático de los jugos cítricos concentrados, en comparación con los de elevada  $a_w$ .

Clegg (1964) estudió la influencia de distintos ácidos sobre la destrucción del AAs (expresada como pardeamiento de la muestra) en sistemas modelo acuosos a  $\text{pH} 2,5$ ;  $4,5$  y  $6,5$ . El máximo oscurecimiento se produjo en todos los casos a pH

4,5 y fue mínimo a 2,5. Los resultados obtenidos indicaron que la influencia sobre el pardeamiento del sistema decrecía según:

ácido cítrico > malónico > tartárico = succínico

Joslyn y Miller (1949) determinaron que aquellos ácidos (o sus sales) que complejan mejor a los iones Cu(II), Fe(III) serían los que protegen más al AAs de su oxidación. Establecieron el siguiente orden decreciente en actividad complejante para los ácidos por ellos investigados:

$C_2O_4^{2-}$  >  $HPO_3$  > citrato > fosfato.

Miller y Joslyn (1949) encontraron una mínima velocidad de oxidación del AAs con el oxígeno del aire, en un buffer fosfato, a pH entre 2,0 y 3,0. Por el contrario, dicha velocidad fue aumentando continuamente entre pH 3,0 y 8,0.

Se debe tener en cuenta además que los ácidos no volátiles, en sí mismos, aceleran la caramelización de los azúcares según lo observado por Andreotti (1957) y por Wong y Stanton (1989). El AAs es también un ácido orgánico y acelera la caramelización de aquéllos, a lo que se suma su propia descomposición.

Pero también se han informado efectos beneficiosos del uso combinado de ácido cítrico y ácido ascórbico en alimentos (Lattanzio y col., 1989).

### **Influencia de la luz y de las enzimas**

La luz visible acelera la velocidad de oxidación del AAs y lo hace en mayor grado cuanto más oxígeno esté disponible (Lin y Agalloco, 1979). En general, no se ha estudiado el efecto de longitudes de onda en particular. La aparente necesidad del oxígeno para el mayor efecto de la luz quizás se deba a que la reacción oxidativa procede por un mecanismo

de radicales libres.

Enzimas como la ascorbato oxidasa y la ascorbato peroxidasa catalizan la oxidación del AAs a DHA. La primera usa oxígeno como aceptor de electrones y la segunda, peróxido de hidrógeno. Estas enzimas se encuentran en plantas y, por lo tanto, están también en alimentos de origen vegetal y deberán ser irreversiblemente, inactivadas mediante el escaldado.

#### **- Material de envasado del alimento**

Vista la influencia de distintos factores en la cinética de descomposición del AAs, deberán ser tenidos en cuenta en el momento de la elección del material del envase con el objeto de preservar al alimento de la pérdida de su valor nutritivo y del deterioro organoléptico.

En el caso de alimentos de actividad de agua reducida deberán usarse materiales impermeables al vapor de agua. La impermeabilidad al oxígeno atmosférico es también una cualidad esencial para la elección del material del envase con el objeto de preservar a la vitamina.

Kacem y col. (1987) determinaron que existe una rápida pérdida del ácido L-ascórbico en jugos de naranja envasados en recipientes de polietileno, debido a la permeabilidad relativa al oxígeno que aquél presenta.

La presencia de oxígeno por no adecuada elección del material del envase no sólo provoca la pérdida rápida de la vitamina sino el incremento del pardeamiento no enzimático del producto durante el almacenamiento.

Es aconsejable la elección de un material que permita el cierre en vacío del envase o el cierre bajo atmósfera inerte, pues la degradación anaeróbica es lenta y no provoca pardeamiento hasta muy avanzado el almacenamiento.

Se ha comprobado que el mejor sistema de envasado para alimentos con alto contenido de vitamina C es el enlatado, previo desaereado y envasado en caliente, con posterior

enfriamiento. Esto se debe a las condiciones reductoras que se crean en el medio ambiente interno, donde se liberan desde el envase al alimento trazas de iones estaño (II), que es reductor. En latas conteniendo alimentos ácidos, la pérdida de estaño II hacia el contenido es mayor. Mannheim condujo un estudio donde probó distintos materiales para el envasado de jugo de naranja pasteurizado: las clásicas latas y bolsas plásticas elaboradas con polietileno-Mylar, polietileno-celofán, saran y polietileno laminado con aluminio. Todo fue almacenado a temperatura ambiente. Sólo se produjo pérdida no significativa de la vitamina en el jugo envasado en latas (Braverman, 1982).

Lamb (1946) comprobó también una retención del 91,6 al 107,5% de la vitamina C en jugo de toronja y del 94,4% al 101,6% en jugo de naranja enlatado, previo desaereado y envasado en caliente con posterior enfriamiento. Comprobó también que la pérdida de vitamina C durante cada paso del procesamiento previo al envasado fue también despreciable.

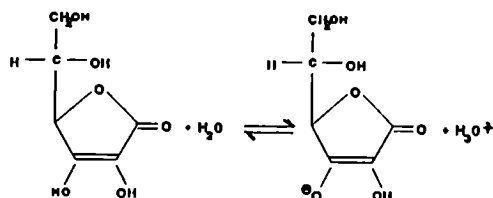
El envase debe constituir además una barrera que impida la penetración de la luz, la que constituye un factor positivo para el deterioro de muchas vitaminas, además del ácido L-ascórbico. Debe recordarse además la importancia del envase para la preservación de la textura del alimento, en aquellos casos en que sea sensible a las tensiones mecánicas normales y su importancia final como elemento de promoción comercial.

#### **1.1.1.n. Métodos de determinación de vitamina C.**

El ácido L-ascórbico es una molécula que se caracteriza por tener:



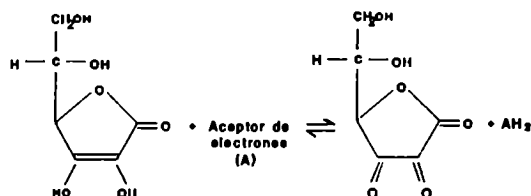
A) Reacción ácido-base ( $pK_{a1} = 4,1$ ):



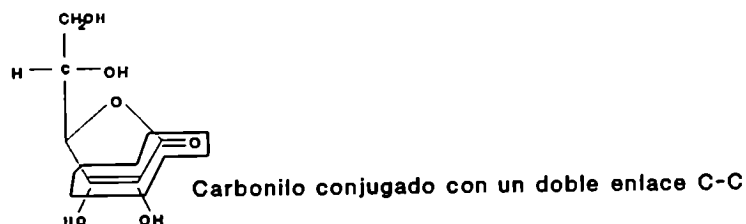
B) Propiedades redox:

$$E^{\circ}_{\text{reduc.}} = + 0,058 \text{ V (pH} = 7,0)$$

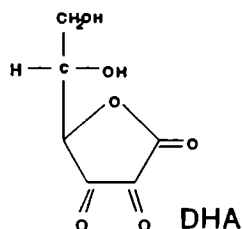
$$E^{\circ}_{\text{reduc.}} = + 0,166 \text{ V (a pH} = 4,0)$$



C) Absorción al ultravioleta:



El ácido deshidroascórbico tiene carbonilos que pueden reaccionar como las cetonas.



Teniendo en cuenta estas propiedades químicas, se han desarrollado una serie de métodos para la determinación cuantitativa del ácido ascórbico.

## - Reacción ácido-base

El ácido ascórbico puede ser determinado por una volumetría ácido-base en medio acuoso, lo que permitirá la titulación de su grupo ácido más fuerte ( $pK_{a1} = 4,1$ ) solamente. Para indicar el punto final puede utilizarse un indicador colorimétrico o bien determinarlo por potenciometría. Desde luego que este método sólo permite cuantificar al ácido en cuestión si éste se encuentra solo o en mezcla con sustancias que no presenten reacción ácida en estas condiciones. Por lo tanto no será posible determinarlo en muestras de composición compleja: alimentos, sangre, orina. Se trata sólo de una forma de determinación inespecífica.

## - Propiedades redox

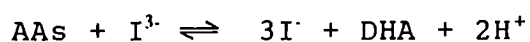
El hecho de ser un fuerte reductor, ha hecho que el ácido L-ascórbico sea determinado principalmente en base a esta propiedad. Los reactivos usados son muy diversos.

Se pueden usar diferentes métodos para la cuantificación del resultado de la reacción:

- a) Volumetría redox con indicador interno
- b) Potenciometría redox
- c) Espectrofotometría
- d) Polarografía

En los dos primeros casos se utilizan soluciones de los reactivos, los que son reducidos por el ácido L-ascórbico:

- Solución acuosa de yodo 0,1N. La titulación se realiza en medio ácido (según técnica de la Farmacopea Argentina o de la Farmacopea Estadounidense o USP XXI).

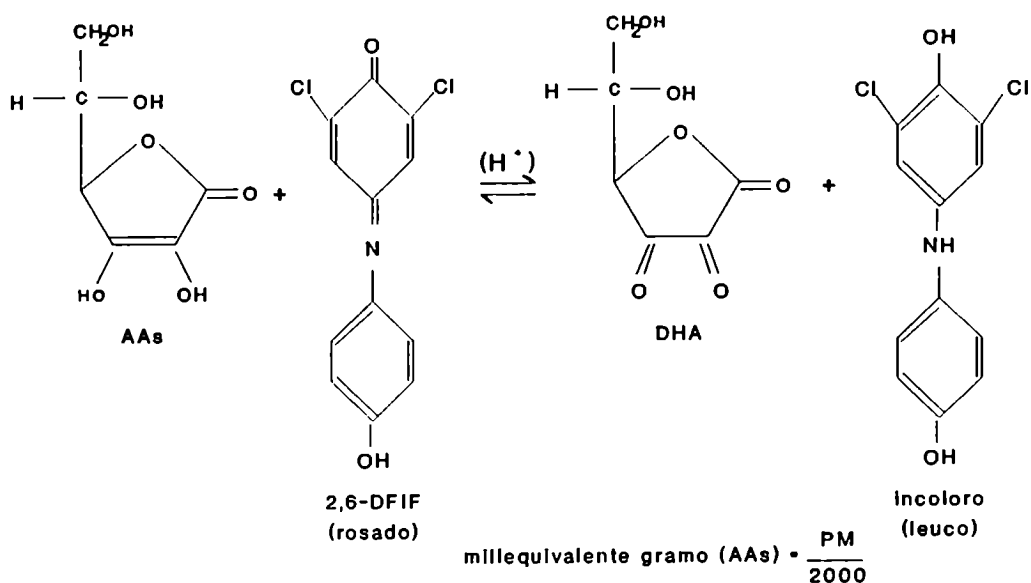


milieq. gramo (AAs) =  $PM/2000$

El yodo como reactivo tiene también la interferencia de sustancias reductoras (sulfito, sulfuro, cianuro, reductonas). En vinos, por ejemplo, se titula AAs con yodo eliminando la interferencia del sulfito por reacción de éste con acetaldehído (Strohecker, 1965).

- Solución acuosa de 2,6-diclorofenol indofenol (2,6 DFIF).

Es el reactivo redox habitualmente usado para la determinación del AAs. Se trata de un colorante cuya forma oxidada es rosada en medio ácido. El final de la titulación es puesto en evidencia por el exceso del colorante sin reducir o, en forma más exacta, a través de la evaluación del salto de potencial ( $\Delta V$ ), mediante una potenciometría (Harris y col., 1942). La determinación se hace en medio de ácido oxálico o de ácido fosfórico o de ácido perclórico (Rolf Strohecker y Hennings, 1965). En medio ácido, el glutatión y otros interferentes no afectan la reacción y la vitamina es estable (Tillmans, 1927).

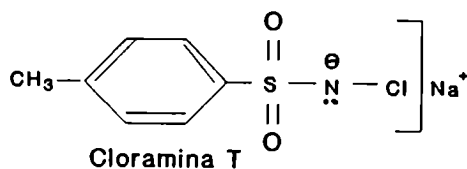


La primera aplicación del 2,6-diclorofenol indofenol al análisis del ácido L-ascórbico fue reportada por Tillmans en 1932.

Una de las técnicas propuestas por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990) para la determinación de vitamina C, usa este reactivo.

- Solución de Cloramina T:

Este reactivo fue sugerido por Leonhardt y Moeser y tiene la ventaja que retiene su título mejor que la solución de yodo. La titulación se hace en medio de HCl.



El AAs es también oxidado a deshidroascórbico y por lo tanto, su miliequivalente gramo será PM/2000 (Strohecker, 1965).

La titulación con solución 0,1N de cloramina T sólo se aplica a preparaciones farmacéuticas que no contengan sustancias oxidables.

En los tres métodos precitados interfieren diversos componentes que se encuentran en los alimentos: compuestos con grupos -SH, reductonas y ácidos reductivos. Por ello, se han desarrollado numerosas modificaciones en la búsqueda de minimizar esas interferencias. Así, por ejemplo, se han desarrollado técnicas espectrofotométricas utilizando el 2,6-diclorofenol indofenol, donde por extracción del exceso de colorante con un solvente orgánico inmiscible con el agua, se aumenta la selectividad y la sensibilidad tal cual se explica a continuación.

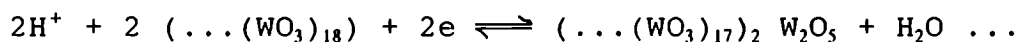
- Espectrofotometría

Aprovechando las características reductoras del ácido L-ascórbico, se han desarrollado un gran número de métodos donde se utilizan diversos reactivos colorimétricos:

- 2,6-diclorofenol indofenol (Robinson y Stotz, 1945).
- fosfo y silicomolibdatos y tungstatos (Isaacs, 1942).
- ferridipiridilo (complejo oxidado del Fe(II) con  $\alpha,\alpha'$ -dipiridilo) (Koenig y col., 1943).
- Complejo del Fe(II) formado con 2,4,6-tripiridil-S-triazina (Pachla y col., 1985).
- Complejo del Fe(II) formado con ferrozina (Pachla y col., 1985).
- Dimetoxiquinona (Eldeway y col., 1975).
- o-toluidina (Pachla y col., 1985).

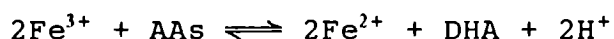
Con el 2,6-diclorofenol indofenol se han desarrollado métodos espectrofotométricos que permiten la determinación de la absorbancia del colorante libre que queda sin reaccionar con la vitamina. La reacción se lleva a cabo en medio ácido (con buffer) para disminuir las interferencias y tener mayor estabilidad de la vitamina. El color, de todas maneras, es inestable con el tiempo pues las reductonas presentes en alimentos procesados y almacenados lo reducen también, aunque mucho más lentamente que al AAs. Por eso se desarrollaron los métodos de extracción del colorante en exceso, con solventes no miscibles con el agua tal como el xileno (Stotz, 1941; Pepkowitz, 1943). Este procedimiento tiene no sólo la ventaja de la estabilidad del 2,6 DFIF en la fase superior xilénica, sino que además evita la interferencia de la turbidez natural de las muestras de origen biológico (por ejemplo, alimentos) y de los colorantes naturales hidrosolubles, los que permanecen en la fase acuosa. Además tiene la ventaja de que, independientemente del volumen total de reacción que se maneje con el medio acuoso, el colorante siempre termina por ser extraído por un volumen constante de solvente orgánico.

Los fosfo y silicomolibdatos y tungstatos son reactivos en los cuales se encuentran exaltadas las propiedades oxidantes del molibdeno y del tungsteno, de manera que el agregado de un reductor como el AAs da lugar a la formación de compuestos del molibdeno y del tungsteno con menor estado de oxidación, de composición no bien conocida y de color azul.



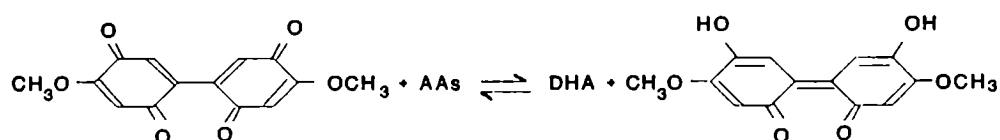
(Kassell B. y Brand, 1938).

El uso de complejantes del ión Fe(II), se basa en la acción reductora del AAs (AAs) sobre iones de metales de transición, como el ión Fe(III).



El ión Fe(II) formado se determina espectrofotométricamente previa complejación con diversos agentes quelantes, los cuales originan un producto coloreado. Estas son en realidad determinaciones indirectas de la vitamina y también están sujetas a muchas interferencias por otros agentes reductores del ión Fe(III).

Para la determinación de ácido L-ascórbico se ha desarrollado también un método basado en la obtención de un producto de color violeta rojizo por reducción de la dimetoxiquinona.



- Polarografía

La electro-oxidación del ácido L-ascórbico frente a un electrodo es irreversible e implica la pérdida de dos electrones y  $2H^+$  para formar ácido deshidroascórbico. Este producto reacciona rápida e irreversiblemente con agua para dar ácido 2,3-dicetogulónico. El ensayo polarográfico se lleva a cabo mejor en un buffer de pH entre 3 y 6. A pH más alto, el AAs es oxidado rápidamente y a pH fuertemente ácido, la onda tiene una pendiente muy pequeña y en consecuencia no puede ser exactamente determinado. El oxalato de sodio se usa como electrolito soporte.

Las reductonas interfieren, pero su onda puede usualmente ser eliminada por agregado de formaldehído. La mayor exactitud es alcanzada a concentraciones entre 25 y 250 microgramos de ácido L-ascórbico por mililitro (Strohecker, 1965).

Gillam (1945) desarrolló un método polarográfico para la determinación de ácido L-ascórbico en frutas y vegetales, el que permite encontrarlo aún en cantidades entre 4 y 85  $\mu\text{g/ml}$  de solución y con una exactitud del 3,3 al 4,3%, según el electrolito soporte usado.

#### - Absorción en el espectro ultravioleta

La longitud de onda a la que absorbe la molécula del ácido L-ascórbico en el espectro ultravioleta cercano depende del pH del medio, ya que éste determina la composición iónica en lo que se refiere a la forma sin disociar, al monoanión y al ascorbato libre (dianión:  $A^{2-}$ ).

Tono y Fujita (1982) desarrollaron un método espectrofotométrico para determinar ácido L-ascórbico en alimentos por diferencia en la absorción espectral, antes y después de ser oxidado por la enzima ascorbato oxidasa. Existió una relación lineal entre la diferencia de las alturas de los picos y la concentración de ácido L-ascórbico.

Los mismos autores desarrollaron luego un método semejante pero donde determinaban AAs en jugos de frutas y vegetales y AAs total (AAs + DHA), donde el ácido DHA es previamente reducido con ditiotreitól.

Los **métodos cromatográficos** son, ciertamente, los más sencillos y específicos en cuanto a que, con igual forma de preparación de la muestra, podemos aislar y cuantificar el AAs, eliminando así las interferencias, en base a la diferente partición de la sustancia en cuestión entre una fase móvil y una fase estacionaria. El más grave problema radica en lo costoso que resulta la implementación y el uso rutinario de un aparato para cromatografía líquida de alta performance (HPLC), que es la que se usa en este caso. Existen los métodos más diferentes para la determinación de la vitamina y en la gran mayoría de ellos la detección se efectúa por su absorción en el espectro ultravioleta (en general, a 254 nm), mediante un espectrofotómetro acoplado a la salida de la columna. Aprovechando este método se busca también determinar el contenido de DHA de la muestra.

Sólo se ha logrado determinar en forma directa el DHA por lectura acoplada al U.V. a una longitud de onda muy baja (210 nm) lo cual no siempre es posible, o bien por medio de un refractómetro, que ya es un sistema universal de medición. Para evitar esto, se suele reducir el DHA de la muestra con ditiotreitól y así determinar el contenido de AAs total (AAs + DHA). Esto evita tener que aplicar el método de reducción del DHA con gas sulfhídrico, el que por ser largo no permite analizar muchas muestras en una jornada de trabajo. Pero también se indica el peligro de oxidación del AAs durante las cromatografías (Henninger G.; Boehringer Mannheim GmbH), en especial durante la preparación de las muestras.

Se han desarrollado **métodos enzimáticos** para la determinación de AAs.

Se utiliza **ascorbato oxidasa**, que es la enzima específica, **ascorbato peroxidasa** y aún otras peroxidases menos específicas. La acción de la enzima sobre su sustrato implicará una diferencia en el espectro de absorción al



ultravioleta (Kelly y Latzko, 1980). En otros casos se determina el oxígeno consumido en la reacción de oxidación del AAs por la ascorbato oxidasa (Marchesini, 1974).

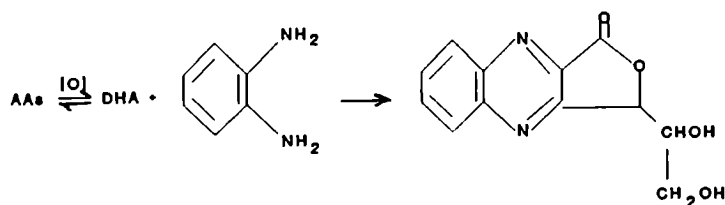
Se puede combinar también la acción de la enzima, como reactivo específico que es, con un método colorimétrico. Por ejemplo, Henniger (Boehringer Mannheim) determina la diferencia de absorbancia a 578 nm entre la muestra cuyo AAs reacciona, junto con otras sustancias reductoras, con una sal de tetrazolio y la muestra cuyo AAs es primero oxidado por la enzima ascorbato oxidasa y posteriormente tratado con la sal de tetrazolio.

Los métodos enzimáticos tienen el problema que estas enzimas no son comercialmente disponibles y además son, económicamente, costosas.

También el AAs puede determinarse a través del ácido deshidroascórbico, previo uso de un agente oxidante.

El ácido deshidroascórbico reacciona con aminas (o-fenilendiamina) y con hidrazinas (2,4-dinitrofenilhidrazinas) por formación de la base de Schiff correspondiente.

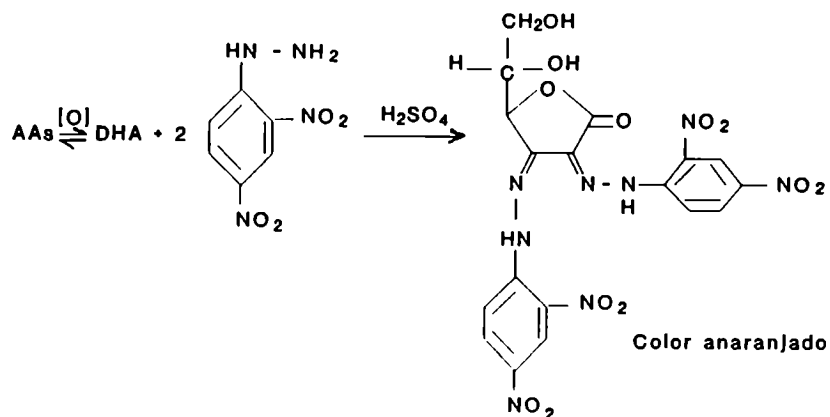
La reacción con o-fenilendiamina provoca la formación de quinoxalina (Pachla y col., 1985).



La quinoxalina es un compuesto fluorescente. Como oxidante se usa un carbón activado llamado Norita, el cual debe ser primero lavado con ácido. Es un método más específico que el de la dinitrofenilhidrazina y muy sensible. Se lo ha adaptado a aparatos del tipo Autoanalizador, el que permite determinar

AAs en nuestras clínicas y en alimentos (DeVries, 1983).

La determinación por reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Roe y Kuether, 1943) es un método muy usado y se basa en que la velocidad de reacción de aquél con DHA es mucho más rápida que con otros carbohidratos presentes en la muestra, la formación de cromógenos de sustancias no AAs es minimizada llevando a cabo la reacción a bajas temperaturas y el color es producido más fácilmente con los derivados del 2,4-DNPH con compuestos de 5 y 6 carbonos.



El ácido 2,3-dicetogulónico también reacciona, pero la concentración de este compuesto es normalmente muy pequeña, aunque interfiere. Se han desarrollado numerosas modificaciones que eliminan en lo posible la interferencia de reductonas generadas durante el procesamiento y el almacenamiento del alimento, de hidratos de carbono en alta concentración y del ácido 2,3 dicetogulónico (Pelletier y col., 1977).

En los párrafos previos se ha reseñado la determinación del AAs. Para dosar la vitamina C, considerando como tal a la suma de ácido ascórbico y deshidroascórbico se trata a la muestra con un reductor (gas sulfhídrico o algún tiol como

ditiotreitól) y posteriormente se analiza el contenido de AAs, expresando el resultado como AAs total o como vitamina C. En otros casos se determina la concentración de AAs antes y después del agregado del agente reductor, discriminando así entre AAs directo y AAs total.

## 2 - OBJETIVOS

El objeto del presente trabajo es estudiar la destrucción de la vitamina C (ácidos ascórbico y deshidroascórbico) durante el procesamiento y durante el almacenamiento, en sistemas modelo acuosos dulces de actividad de agua ( $a_w$ ) 0,94. Dichos sistemas están diseñados de manera que en su composición intervengan aquellas sustancias presentes en los jugos frutales procesados y que se supone son activas desde el punto de vista de la destrucción de la vitamina C y del deterioro organoléptico del producto (pardeamiento).

Se propone así, analizar los siguientes aspectos:

- a) La velocidad de destrucción de la vitamina C bajo la influencia de diferentes agentes depresores de la actividad acuosa (hidratos de carbono y polioles)
- b) El efecto sobre dicha velocidad de diferentes agentes acidificantes y conservadores.
- c) La influencia del aminoácido L-lisina y del estaño (II) sobre la velocidad de destrucción de la vitamina C.
- d) La influencia del pH del medio sobre la estabilidad de la vitamina.
- e) La dependencia de la retención del ácido ascórbico y del ácido ascórbico total con las diferentes temperaturas de procesamiento y de almacenamiento ensayadas.
- f) La relación entre el pardeamiento del producto y la pérdida de la vitamina.
- g) La influencia del oxígeno sobre la destrucción del ácido ascórbico en las condiciones estudiadas y la relación con el pardeamiento.

### 3 - MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. GENERALIDADES

Existen muchos factores que afectan la destrucción del ácido L-ascórbico y como además están interrelacionados, no es factible considerar el efecto de uno de ellos, sin tener en cuenta a los otros. Por esto, el empleo de sistemas modelo resulta particularmente adecuado para proveer información sobre cada variable implicada, independientemente de las demás, y así poder interpretar el comportamiento de sistemas más complejos.

Se trabajó sobre un sistema base constituido por:

- a) Agua como solvente.
- b) Un agente depresor de la actividad de agua (azúcares, polioles).
- c) Acido L-ascórbico.
- d) Un agente conservador.
- e) Un ácido para ajustar el pH.

Sobre esta composición básica se efectuaron otros agregados, según el caso. Mediante estos sistemas se pudo comparar el efecto sobre la cinética de destrucción del ácido ascórbico de los distintos agentes humectantes, de distintos conservadores que habitualmente son utilizados en los jugos de fruta listos para el consumo, de distintos acidificantes así como también el efecto de distintos pH. Además se determinó la influencia del aminoácido L-lisina y del catión estañoso ( $\text{Sn}^{II}$ ) que habitualmente se encuentra presente en alimentos ácidos envasados en latas.

La concentración usada del agente humectante en cada sistema fue la necesaria para obtener una actividad de agua final de 0,94.

Para calcular la cantidad de humectante se utilizó la ecuación de Norrish (Chirife y col., 1980) que permite predecir la actividad de agua de sistemas binarios de no electrolitos:

$$a_w = X_w \cdot e^{-K \cdot X_2}$$

donde la constante de interacción (K), toma los siguientes valores:

Sorbitol	K = 1,65
Glucosa	K = 2,25
Sacarosa	K = 6,47

y:  $X_w$  = fracción molar de agua en el sistema  
 $X_2$  = fracción molar del soluto (humectante)

$$X_w = \frac{n_w}{n_w + n_2} \qquad X_2 = \frac{n_2}{n_w + n_2}$$

$$n = \frac{w}{M}$$

$n$  = número de moles de sustancia  
 $M$  = peso molecular de la sustancia  
 $w$  = peso (en gramos) de la sustancia  
 $n_w$  y  $n_2$  = número de moles del agua y del soluto,  
 respectivamente

En todos los casos se verificó por medida con un higrómetro Novassina (Suiza) la exactitud de los cálculos realizados, modificándose en caso necesario, la composición del sistema.

### 3.2. PREPARACION DE LOS SISTEMAS MODELO

Al agente depresor de la actividad de agua se lo disolvió en la cantidad necesaria de agua destilada, según la composición cuantitativa del sistema. A continuación se procedió con la disolución del agente conservador y del ácido L-ascórbico, para finalmente ajustar el pH del sistema con una solución acuosa del ácido usado, según el caso. Para ello se utilizó un pH-metro Metrohm E-632 (Suiza) con su electrodo combinado de vidrio -  $\text{Ag}^+/\text{ClAg}$ , de la misma firma.

En aquellos sistemas modelo donde correspondía, previo al ajuste del pH, se agregó también bisulfito de sodio o el aminoácido L-lisina (en forma de clorhidrato) o cloruro estañoso dihidratado ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (fuente de  $\text{Sn}^{2+}$ ). En este último caso se usó solución de ácido cítrico para disolver la sal, previo a su agregado al sistema. A continuación se ajustó la solución final al pH elegido.

Para asegurar condiciones constantes de mezclado y, en consecuencia, de incorporación de oxígeno, se homogeneizaron los sistemas con un agitador de hélice a una velocidad de 3200 rpm y se trabajó a temperatura constante de 25°C, en una cámara termostatzada.

En la Tabla 8 se indica la composición de los distintos sistemas estudiados, indicándose además la actividad de agua y el pH de los mismos.

Las soluciones así preparadas se envasaron en frascos cilíndricos de vidrio de 60 ml de capacidad total o en tubos cilíndricos del mismo material de 20 mm de diámetro e igual capacidad total, en los cuales se medía la concentración de oxígeno con el electrodo. Cada envase fue llenado completamente de manera de no dejar cámara de aire (envasado sin espacio de cabeza). Se trató de esta manera de reproducir las condiciones del envasado en latas de los jugos de frutas o de productos semejantes, donde la concentración de oxígeno disuelto residual es limitada. Los sistemas modelo "control" (K) y con glucosa (pH = 3,50)(A) fueron también envasados en

Tabla 8. Composición de los sistemas modelo

Sist.	Glucosa (% P/P)	Sacarosa (% P/P)	Sorbitol (% P/P)	Sorbato de K (% P/P)	Ac.L-ascór-bico (% P/P)	NaSO <sub>3</sub> H (% P/P)	L-lisina (% P/P)	Sn II (ppm)	Ac.propió-nico (% P/P)	Ac.cítrico csp. pH	Ac.fosfó-rico csp.	Agua csp.	am	(1)	(2)
A	36	- -	- -	0,100	0,035	- -	- -	- -	- -	3,5	- -	100 g	0,94	a,b	An,Ae
B	36	- -	- -	0,100	0,035	- -	- -	- -	- -	4,1	- -	100 g	0,94	b	An
C	36	- -	- -	0,100	0,035	- -	- -	- -	- -	5,0	- -	100 g	0,94	b	An
D	- -	34	- -	0,100	0,035	- -	- -	- -	- -	3,5	- -	100 g	0,94	a,b	An
E	- -	- -	52	0,100	0,035	- -	- -	- -	- -	3,5	- -	100 g	0,94	a,b	An
F	36	- -	- -	0,100	0,035	- -	1,72	- -	- -	3,5	- -	100 g	0,94	b	An
G	36	- -	- -	0,100	0,035	- -	- -	10	- -	3,5	- -	100 g	0,94	b	An
H	36	- -	- -	0,100	0,035	- -	- -	- -	0,100	3,5	- -	100 g	0,94	b	An
I	36	- -	- -	0,100	0,035	- -	- -	- -	- -	- -	pH=3,5	100 g	0,94	b	An
J	36	- -	- -	0,100	0,035	0,0150	- -	- -	- -	3,5	- -	100 g	0,94	a,b	An
K	- -	- -	- -	0,100	0,035	- -	- -	- -	- -	3,5	- -	100 g	0,94	a,b	An,Ae

(1) Temperaturas analizadas  
a: 24°, 33° y 45°C  
b: 70°, 80° y 90°C

(2) Condiciones de llenado  
An: sin cámara de aire  
Ae: con cámara de aire



frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, colocando en cada uno de éstos sólo 60 ml del sistema correspondiente. De esta manera se aseguró una gran superficie de contacto entre la solución envasada y la cámara de aire en contacto con aquélla, así como suficiente provisión de oxígeno durante la experiencia; ello permitió extraer conclusiones sobre la destrucción de la vitamina C en condiciones aeróbicas.

Se trabajó por duplicado, tanto en lo que concierne al almacenamiento como en los dosajes correspondientes.

Los recipientes fueron cerrados y sellados para asegurar la hermeticidad y cubiertos exteriormente con papel de aluminio. Las soluciones así envasadas fueron almacenadas a temperaturas de 24°; 33°; 45°; 70°; 80° y 90°C ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) durante distintos períodos de tiempo. Para ello se utilizaron estufas con circulación forzada de aire para asegurar la uniformidad en la temperatura, evitando gradientes de la misma (Memmert 854 Schabach, W. Germany).

### **3.3. METODOLOGIA DE TRABAJO**

En el sistema recién preparado y en las muestras correspondientes a los distintos tiempos de tratamiento, se procedió a efectuar las siguientes determinaciones:

- a) Concentración de ácido L-ascórbico (AAs).
- b) Concentración de vitamina C (ácido ascórbico + ácido deshidroascórbico).
- c) pH.
- d) Concentración de oxígeno disuelto.
- e) Absorbancia de la muestra a 420 nm.
- f) Actividad de agua ( $a_w^{\circ}$ ).

### 3.3.1. Concentración de ácido L-(+)-ascórbico

La concentración de ácido ascórbico y de vitamina C fue determinada mediante el uso del reactivo redox 2,6-diclorofenolin-dofenol, cuyo exceso sin reaccionar con los componentes reductores de la muestra, fue extraído con un volumen constante de xileno y medida su absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch & Lomb, USA) a 500 nm de longitud de onda. Se utilizó un procedimiento que fue adaptado especialmente a este estudio en particular, lográndose minimizar las interferencias que existieron desde un principio en cada sistema o que aparecieron luego del almacenamiento. Este método también fue aplicado a la determinación de la vitamina C en diversas frutas, obteniéndose resultados igualmente correctos.

El problema radica en que estos sistemas van sufriendo pardeamiento paulatino durante su tratamiento térmico y, en consecuencia, no es posible aplicar el método de titulación con el reactivo redox mencionado, pues no es posible la visualización adecuada del punto final. Este se vería además afectado por un elevado error de titulación, pues ya la **concentración inicial** de AAs en los diferentes sistemas, es lo suficientemente baja como para que ello así ocurra ( $4 \times 10^{-3}N$ ). Esto también afectaría de igual manera la detección alternativa del punto final por potenciometría. A su vez, la presencia de numerosas sustancias reductoras tardías en el seno de la solución, contribuirían a disminuir aún más el índice de agudeza de la titulación. De esta manera se optó por el citado método extractivo con un solvente orgánico inmiscible, el que permitía **aislar inmediatamente** al reactivo redox del medio acuoso (Robinson y Stotz, 1945). La lectura espectrofotométrica de la fase orgánica, constituyó un método para aumentar considerablemente la sensibilidad de la reacción.

Con el objeto de aumentar la selectividad de la reacción, para ser aplicada a los sistemas en estudio, se

optimizó el método indicado por Montes (1975). De esta manera, el agregado inicial de buffer acetato (pH 4,0), asegura que el medio alcance un pH mínimo y regulado de 3,8. Este pH es el necesario para que el AAs dé fácilmente la reacción de "condensación" con el formaldehído. A este pH también reaccionan con igual facilidad el bisulfito, tiosulfato, sulfuro de hidrógeno, cisteína (Lugg, 1942). Sin embargo, a ningún pH "condensan" con el formaldehído las reductonas, la tiourea. De todas estas sustancias, los únicos potencialmente presentes en los sistemas modelo son (además del AAs) el bisulfito, el sulfuro de hidrógeno (residual), los iones de metales de transición en el estado con menor número de oxidación y las reductonas. De esta manera, **tratando primero** a la muestra con agua oxigenada (en medio ácido regulado), ya se oxida el bisulfito a sulfato y el ión Fe(II) a Fe(III) (Freed, 1966; Montes, 1975; Robinson y Stotz, 1945; Levy, 1943), de manera que sólo resta para reaccionar con el formaldehído el AAs. Las reductonas permanecerán como tal y, por lo tanto, se corre el riesgo de que reaccionen con el 2,6-diclorofenol indofenol en el corto tiempo de contacto, previo a la extracción con xileno del exceso de colorante. Este es justamente el objeto del tratamiento de la muestra con formaldehído. La diferencia entre la "absorbancia" de la muestra y la "absorbancia" de la muestra tratada con formaldehído, dará la absorbancia neta correspondiente al AAs solamente, eliminando así la reactividad de las reductonas presentes en el medio. Se verificó que la reacción con el formaldehído (13 M o 40% p/v) a pH 3,8 tuviese tiempo suficiente para ocurrir en 10 min, a temperatura ambiente y para cualquier condición (Snow y Zilva, 1943).

En lo que se refiere al agua oxigenada utilizada, distintos autores proponen distintas concentraciones y volúmenes a usar de aquélla en los extractos ácidos. En el presente trabajo se pudo determinar que el agregado de tres gotas de solución de agua oxigenada 10% v/v decoloraba, en un tiempo no mayor de cinco minutos, los pigmentos presentes

en la mayoría de los productos naturales que fueron analizados para poner a punto esta técnica. Asimismo, bloqueaba adecuadamente las cantidades que habitualmente se pueden encontrar de bisulfito,  $\text{Sn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ .

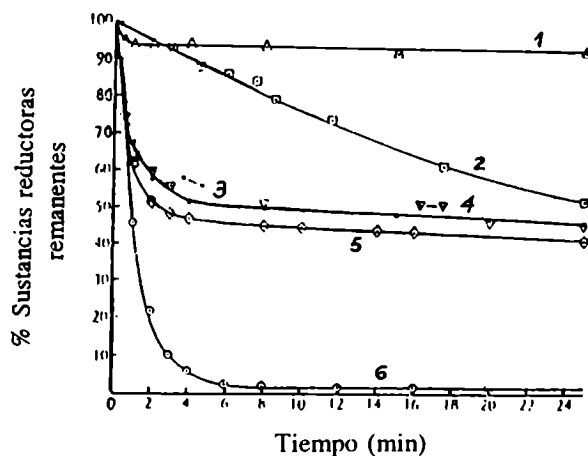


Fig. 35. Reacción de varias sustancias reductoras con formaldehído a pH 3,5. Concentración inicial de sustancias reductoras: 0,46 mM. Concentración de formaldehído: 0,52 M. Temperatura 25°C. 1: ácido reductico. 2: reductona. 3: ácido 6-isopropilén ascórbico. 4: ácido 6-tritil ascórbico. 5: ácido 6-desoxi ascórbico. 6: ácido L-ascórbico (Snow y Zilva, 1943).

La presencia de  $\text{Cu(II)}$  en las proporciones habituales no interfiere en la técnica.

Para la determinación del ácido L-ascórbico, se retiró de la estufa correspondiente una muestra con su duplicado al tiempo estipulado y fueron enfriadas rápidamente hasta alcanzar la temperatura ambiente por inmersión del recipiente cerrado en agua fría. A continuación y previa homogeneización, fue pesada una alícuota de cada muestra en un matraz aforado de 100 ml de capacidad, utilizando para ello una balanza granataria (Mettler, modelo P 1200) que permitía una precisión de 0,01 g. A continuación, se diluyó hasta el volumen final del matraz con solución de ácido oxálico 1% P/V o con solución de ácido metafosfórico al 6%

P/V. Este último tiene una ventaja sobre el primero: su acción desproteinizante, la que no fue necesaria para ninguno de los sistemas modelo estudiados. En éstos se comprobaron resultados semejantes con cualquiera de los dos ácidos, por lo que se eligió trabajar con el primero.

La cantidad pesada de muestra debía ser tal que la dilución final efectuada en el matraz resultara tener entre 10 y 150  $\mu\text{g}$  de ácido L-ascórbico en no más de 5,0 ml de solución. Luego de homogeneizar perfectamente la solución, se procedió a la determinación midiendo, con pipeta de doble aforo, una alícuota no mayor a 5,0 ml de la dilución obtenida, colocándola en tubos de vidrio de capacidad adecuada. A continuación se agregaron los distintos reactivos, según se indica en la Tabla 10.

En el caso de haber necesitado usar alícuotas de muestra menores a 5,0 ml, se completó con el ácido oxálico (solución 1% P/V) hasta dicho volumen final. El medio ácido asegura que la vitamina sea lo más estable posible. Además el ácido oxálico y el ácido metafosfórico estabilizan especialmente al grupo enediol y desnaturalizan las proteínas, eliminando así la actividad enzimática. El ácido metafosfórico también protege al AAs del peligro de oxidación por iones  $\text{Fe(III)}$  o  $\text{Cu(II)}$  (Levy, 1943).

El buffer asegura el mantenimiento de un pH constante y de aproximadamente 3,8 el cual es necesario para que el ácido L-ascórbico reaccione rápidamente (dentro de los 10 minutos) con el formaldehído (Lugg, 1942; Snow y Zilva, 1944). De esta manera, por diferencia entre el tubo de Absorbancia de la muestra y Absorbancia de la muestra con formaldehído, resulta la Absorbancia debida al ácido ascórbico presente.

Se debe destacar que **inmediatamente después** del agregado de 2,6-diclorofenolindofenol en cada tubo, se homogeiniza y se lo extrae rápidamente con el xileno. Si esto no se hiciera, sustancias reductoras tardías decolorarán paulatinamente al reactivo.

Tabla 9

Reactivos	Absorbancia de la muestra (A <sub>M</sub> )	Blanco de la muestra (A <sub>B(M)</sub> )	Absorb. de la muestra con formaldehído (A <sub>C<sub>H</sub>20</sub> )	Blanco de la muestra con formaldehído (A <sub>B(C<sub>H</sub>20)</sub> )
Dilución de la muestra (ml)	5,0	--	5,0	--
Solución de ácido oxálico-1% P/V(ml)	--	5,0	--	5,0
Buffer AcNa/AcH pH=4,0 (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0
Agua oxigenada 10% V/V (gotas)	III	III	III	III
Dejar reaccionar 5 minutos				
Agua destilada (ml)	2,5	2,5	--	--
Formaldehído 40% (ml)	--	--	2,5	2,5
Dejar reaccionar 10 minutos				
2,6-diclorofenol-indofenol-0,080 g/l (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0
XILENO (ml)	15,0	15,0	15,0	15,0
Agitar enérgicamente 40 segundos para extraer				

El 2,6-diclorofenolindofenol es estandarizado mediante la curva de calibración que se efectúa según se indica en la Tabla 11, usando una solución patrón de ácido L-ascórbico de 50 µg/ml. Cumple la ley de Lambert y Beer entre los 5 µg y 150 µg de AAs indicados en la Tabla 10 (volúmenes de 0,1 ml a 3,0 ml).

Cálculo de la concentración de AAs en la muestra:

$$A'_{M} \xrightarrow{\text{curva de calibración}} C_M$$

$$A'_{CH20} \xrightarrow{\text{curva de calibración}} C_{CH20}$$

de lo que resulta:

$$C_{AAs}(\text{mg}/100 \text{ ml}) = \frac{(C_M - C_{CH2O}) \cdot 100 \cdot 100}{P_{Mtra} \cdot V_{alic.}}$$

$$A'_M = A_M - A_{B(M)}$$

$$A'_{CH2O} = A_{CH2O} - A_{B(CH2O)}$$

$A_{B(M)}$  = Absorbancia del blanco de la muestra

$A_{B(CH2O)}$  = Absorbancia del blanco con formaldehído

$C_M$  = mg de sustancias reductoras + AAs, en el  $V_{alic.}$

$C_{CH2O}$  = mg de sustancias reductoras (sin AAs), en el  $V_{alic.}$  usado

$V_{alic.}$  = Volumen de la dilución de la muestra del sistema, usado en la colorimetría (Tabla 10)

$P_{Mtra}$  = cantidad de sistema, pesada en el matraz aforado.

**Tabla 10. Curva de calibración**

Reactivos	Estándares									*Blanco de reactivos
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Solución estándar de ácido ascórbico (ml)	-	0,10	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	-
Solución de ácido oxálico 1% P/V (ml)	5,0	4,9	4,75	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	5,0
Buffer acetato pH 4,0 (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Agua oxigenada 10% V/V (gotas)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Dejar reaccionar 5 minutos										
Agua destilada (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	7,5
Solución de 2,6-dicloro-fenolindofenol (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Xileno (ml)	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Extraer agitando enérgicamente cada tubo durante 40 segundos										

A: Absorbancia

\*: Se usa para fijar el 0% de A (100% de T) en el espectrofotómetro.

En el Apéndice 1 se explica la evaluación estadística realizada de esta técnica propuesta.

### **3.3.2. Concentración de vitamina C**

La concentración de vitamina C se determinó separando aproximadamente la mitad de la dilución del sistema efectuada en el matraz aforado de 100 ml. En esta solución se hace burbujear gas sulfuro de hidrógeno (99,0% Mattheson, USA) durante treinta minutos, dejando luego en contacto con el gas durante dos horas, protegido de la luz. Posteriormente se elimina el sulfuro de hidrógeno de la solución por medio de una corriente de gas nitrógeno (libre de oxígeno, calidad SS, "La Oxígena" S.A., Argentina) que se deja circular durante treinta minutos, hasta reacción negativa en papel embebido en solución de acetato de plomo. En la técnica de cuantificación puesta a punto para el presente trabajo, se comprobó que los tiempos de contacto establecidos para cada gas fueron suficientes para asegurar la completitud de la reacción en cuestión y la remoción del sulfuro de hidrógeno residual. A continuación se determina el contenido de ácido ascórbico total (AAs + DHA) o vitamina C de la misma manera que en el ítem 3.2.a.

El gas sulfuro de hidrógeno reduce el ácido deshidroascórbico que se pudo llegar a formar a expensas del oxígeno disuelto residual en el sistema modelo almacenado, a ácido L-ascórbico. Así se determinó el contenido real de vitamina C.

### **3.3.3. pH de la muestra**

Con el resto de la muestra retirada de la estufa de almacenamiento a temperatura constante, se procedió a determinar el pH utilizando un electrodo combinado de vidrio - Ag<sup>o</sup>/ClAg conectado a un peachímetro (Metrohm, modelo E-632, Suiza). Este fue previamente calibrado con soluciones buffers patrones de:



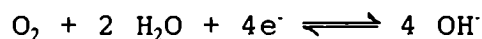
patrones de:

- Solución reguladora de  
pH = 7,00  
Solución reguladora de  
pH = 4,00

#### 3.3.4. Concentración de oxígeno disuelto

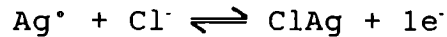
La concentración de oxígeno disuelto se determinó en la muestra envasada para tal fin en tubos de vidrio de 20 mm de diámetro interno y 60 ml de capacidad total y que fueron llenados completamente con el sistema modelo tal cual se indicó en "preparación de la muestra". Esta concentración se determinó a tiempo cero y a cada intervalo de tiempo en que se retiró muestra para las determinaciones correspondientes. Para esto se utilizó un electrodo para oxígeno disuelto (Orion Research, Modelo 97-08, USA) conectado al peachímetro (Metrohm, modelo E-632, Suiza) y calibrado de tal manera que por lectura directa se obtiene la concentración de oxígeno disuelto en agua, expresada en ppm, a 25°C ya que la lectura es automáticamente corregida por el efecto de la temperatura diversa de la solución en el momento de la lectura y por el efecto de la presión atmosférica del momento (presión total).

El electrodo para medir oxígeno disuelto es un sistema polarográfico del tipo descrito por Clark en 1956. Está constituido por dos electrodos de plata y un electrolito, separado de la muestra por una membrana permeable a gases. El oxígeno difunde a través de la membrana y se reduce a iones hidróxido en el cátodo de plata, según:



Los electrones necesarios para esta reacción son provistos por el ánodo de plata. El electrolito contiene iones cloruro

y, por lo tanto, ocurre la siguiente reacción:



A una temperatura dada, la corriente que fluye entre ánodo y cátodo es directamente proporcional al nivel de oxígeno fuera de la membrana.

Para realizar la determinación de la concentración de oxígeno disuelto en las soluciones acuosas, el electrodo se calibra en aire saturado de vapor de agua (en lugar de agua saturada de aire), colocando la lectura de la escala del peachímetro en la presión barométrica del aire, en el momento de la medición.

Los electrodos para determinar oxígeno no miden directamente la concentración de dicho gas sino su **presión parcial**. La conversión de presión parcial a concentración de oxígeno puede efectuarse electrónicamente, debido a la relación constante y predecible entre la solubilidad del oxígeno (a la temperatura de la muestra) y la presión atmosférica. Además, en condiciones de equilibrio, la presión parcial o actividad del oxígeno en agua saturada de aire es igual a la del oxígeno en el aire húmedo sobre el agua.

La presión parcial de cualquier gas en aire se define como la presión total multiplicada por la fracción (en volumen) presente de dicho gas.

$$P_{O_2} = P_T \cdot X_{O_2|gaseosa}$$

En aire, la fracción de oxígeno es 0,209 (20,9%), por lo tanto, la presión parcial de oxígeno en aire **seco** es 159 mm Hg (si la presión total es 760 mm Hg). Pero dicha presión parcial se modifica en presencia de vapor de agua en la fase gaseosa:

$$P_T = P_{O_2} + P_{N_2} + P_{V(H_2O)}$$

$$P_{O_2} = (P_T - P_{V(H_2O)}) \cdot X_{O_2|gaseosa}$$

Por ejemplo, a 20°C, la presión parcial de oxígeno será:

$$p_{O_2} = (760 - 17,5) \text{ mm Hg} \quad 0,209$$

$$p_{O_2} = 155 \text{ mm Hg}$$

Es importante destacar que, a una temperatura dada, la **presión parcial de oxígeno en aire saturado de agua es exactamente la misma que en agua saturada de aire**. Esto significa que un electrodo que se calibra en función de la presión parcial de aire saturado de agua, leerá correctamente la presión parcial del oxígeno disuelto en una **muestra de agua**.

Aunque un electrodo mide la presión parcial del oxígeno, puede ser calibrado en términos de concentración y usado así para leer directamente oxígeno disuelto, en partes por millón. Para hacer esto deben considerarse varios factores adicionales. Primero, la **solubilidad** del oxígeno en agua varía fuertemente en función de la temperatura, tal como se ve en la siguiente tabla:

**Tabla 11. Solubilidad del oxígeno.**

Temperatura (°C)	Presión de vapor de H <sub>2</sub> O (mm Hg)	Solubilidad del O <sub>2</sub> (ppm)
10	9,2	11,28
15	12,8	10,07
20	17,5	9,08
25	23,8	8,26
30	31,8	7,57
35	42,2	6,98
40	55,3	6,47

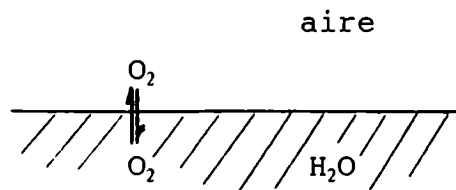
Segundo, la solubilidad también depende de la presencia de solutos en el agua.

Como para realizar el presente trabajo, el electrodo se calibró en aire saturado con agua, las lecturas de concentración de oxígeno disuelto corresponden en realidad a aquéllas en agua y **no** en soluciones azucaradas, como es el caso de los sistemas modelo estudiados (excepto el sistema K).

Según la ley de Henry, la masa de gas disuelta por un volumen dado de solvente, a temperatura constante, es proporcional a la presión del gas en equilibrio con la solución. Si llamo  $w$  a la masa de gas disuelta por unidad de volumen de solvente a la presión  $p$  de equilibrio, de acuerdo con la ley de Henry resulta:

$$w = K \cdot p$$

donde  $K$  es la constante de proporcionalidad. En consecuencia,  $w$  será la **solubilidad** del gas a la temperatura considerada. La constante  $K$  es en realidad la constante de equilibrio entre el  $O_2$  en la fase gaseosa y el oxígeno disuelto en la solución:



Multiplicando la presión parcial de oxígeno medida por el electrodo, por la solubilidad del oxígeno en el agua, resultará la concentración de oxígeno **disuelto en el agua**. Esto es lo que resulta de la medición realizada con el electrodo:

$$C_{O_2(\text{leída})} = p_{O_2} \quad S_{b_{O_2|H_2O}}$$

donde:  $p_{O_2}$  = presión parcial de oxígeno (a la  $P_T$  del día) que realmente mide el electrodo.

$S_{b_{O_2|H_2O}}$  = solubilidad del oxígeno en el agua.

$C_{O_2(leída)} =$  concentración de oxígeno disuelto leída en el instrumento, expresada en ppm.

Pero la solubilidad de oxígeno en el agua es diferente de la solubilidad del oxígeno en las soluciones de azúcares, a una determinada temperatura:

$$Sb_{O_2|H_2O} > Sb_{O_2|sol.azúc.}$$

Por lo tanto, la **concentración real** de oxígeno disuelto en las soluciones de azúcares, será:

$$C_{O_2(real)} = \frac{C_{O_2(leída)}}{Sb_{O_2|H_2O}} \cdot Sb_{O_2|sol.azúc.}$$

Sadler y col. (1988) desarrollaron ecuaciones que permiten predecir la solubilidad del oxígeno disuelto, basadas en las concentraciones de los componentes principales del alimento. Usando valores para azúcares a todas las temperaturas y para jugos de fruta a 25°C, determinaron una ecuación para predecir la solubilidad del oxígeno en soluciones azucaradas y jugos, **saturadas con aire** (presión parcial de oxígeno: 0,21 atm), a cualquier temperatura entre 4° y 40°C a la presión atmosférica:

$$\ln[O_2 \text{ ppm}] = 2,63 - 0,0179.(^{\circ}\text{Brix}) - 0,0190.(^{\circ}\text{C})$$

donde:

[O<sub>2</sub> ppm]: concentración de oxígeno disuelto expresado en ppm.

°Brix: concentración de azúcares expresada en grados Brix.

°C: temperatura ambiente, expresada en grados centígrados.

### **3.3.5. Determinación de la absorbancia de la muestra a 420 nm de longitud de onda**

Se determinó en cada caso el grado de pardeamiento alcanzado por las muestras retiradas del almacenamiento a temperatura constante. Esto se hizo midiendo la absorbancia de las mismas a 420 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch & Lomb, USA). Se utilizó como blanco una alícuota del sistema recién preparado (absorbancia a tiempo cero).

Una forma sencilla para determinar el grado de pardeamiento de un sistema transparente consiste justamente en determinar la absorbancia de la muestra a una longitud de onda fija que, en general, puede ser elegida entre 420 y 550 nm, que es donde presentan su absorción máxima los pigmentos amarillos-pardos que se forman progresivamente. Se correlacionó la aparición de color con la descomposición del AAs, en cada sistema modelo y para cada condición.

### **3.3.6. Actividad de agua**

Fueron efectuadas las determinaciones de la actividad de agua en el sistema modelo a tiempo cero y cada vez que se retiraba una muestra con su duplicado del almacenamiento a temperatura constante, de manera de controlar si ocurría modificación de dicho valor. La razón para ello es que una modificación de la actividad acuosa ( $a_w$ ) afectaría los resultados del análisis, los cuales suponen  $a_w$  constante.

Las mediciones se efectuaron en un higrómetro electrónico Novassina Thermoconstanter Humidat TH2 meter fabricado por Novassina AG (CH-8050 Zurich, Suiza), con una precisión en la lectura de  $\pm 0,001$ , teniendo en cuenta las consideraciones efectuadas al respecto por Kitic y col. (1986).

El higrómetro fue calibrado con soluciones salinas saturadas de actividad de agua conocida, a 25°C y en el rango de  $a_w$  de la muestra. Se utilizaron las siguientes soluciones

saturadas (Chirife y col., 1983):

Sal	$a_w^0$ (25°C)
Cl <sub>2</sub> Ba	0,902
NO <sub>3</sub> K	0,926
SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	0,972

#### 3.4. ENSAYO DE PARDEAMIENTO NO ENZIMATICO (PNE) A 80°C

Se realizó además un estudio comparativo de la velocidad de pardeamiento no enzimático de los sistemas modelo estudiados, **con y sin** la presencia de ácido L-(+)-ascórbico en su composición. Para ello se prepararon los sistemas modelo ya citados (Tabla 8) y de la misma manera ya indicada en el ítem 3.2. Cada sistema se elaboró por duplicado, a uno de los cuales no se le agregó el ácido L-(+)-ascórbico. Se envasaron separadamente en tubos de ensayo de 12 ml de capacidad total con tapa de cierre a rosca, llenándolos completamente con la solución correspondiente, sin dejar espacio de cabeza tal como fuera hecho en los otros casos. Cada punto fue almacenado por duplicado. Los recipientes fueron cerrados y sellados para asegurar la hermeticidad y cubiertos exteriormente con papel de aluminio.

Para analizar el comportamiento del pardeamiento no enzimático en presencia de oxígeno, se hizo el mismo ensayo con los sistemas control (K) y con glucosa (A) envasados dejando cámara de aire o espacio de cabeza de la misma forma en que se hizo para la determinación de la cinética de destrucción del AAs.

Las soluciones así envasadas fueron almacenadas a temperatura constante de 80°C ± 0,5°C en estufa con circulación forzada de aire. Se determinó en el

espectrofotómetro la absorbancia a 420 nm de longitud de onda de cada muestra, retirada de la estufa a distintos tiempos de almacenamiento.

### **3.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en cada caso se sometieron al análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados (Garrido y Sarchi, 1990; Sokal y Rohlf, 1969), lo que permitió obtener los estimadores de las pendientes. Estas pendientes son las constantes cinéticas o las energías de activación, según el caso. Este análisis permitió también establecer, mediante la determinación del estadístico F (de Fisher), si existió realmente una regresión de tipo lineal entre los datos.

Para determinar si existía o no diferencia significativa entre las constantes cinéticas o entre las energías de activación (pendientes halladas) se aplicó el análisis de covarianza (ANACOVA), que permite determinar diferencias significativas entre las pendientes de las regresiones lineales (Sokal y Rohlf, 1969). El análisis se hizo en todos los casos considerando una probabilidad del 95%.

Con el objeto de facilitar los cálculos, en ambos análisis estadísticos se trasladaron todas las ecuaciones a un programa de planilla de cálculo (QUATTRO PRO, versión 3.01, Borland Int. Inc., Copyright 1991) para computadora tipo PC. Así se grabaron en dos archivos diferentes las planillas de cálculo conteniendo todas las ecuaciones necesarias combinadas con columnas vacías iniciales en las cuales, con sólo cargar los datos obtenidos para cada sistema modelo, por ejemplo, se obtienen instantáneamente los parámetros deseados. En el Apéndice de estadística se explicita en detalle el análisis de regresión lineal y el análisis de covarianza utilizados.



Para el cálculo de la energía de activación, se contaba con sólo tres temperaturas y, en consecuencia, sólo tres constantes de velocidad de destrucción de AAs con las cuales efectuar el análisis de regresión, con lo cual no se podría nunca obtener un F de Fisher tal que indicara que efectivamente existe una regresión lineal significativa. Lo que se hizo entonces fue aplicar el análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos ya indicado, pero considerando como datos sólo los límites de confianza superior e inferior de cada constante de velocidad de reacción para un sistema modelo dado, de tal manera que, para las tres temperaturas ensayadas (24°; 33° y 45°C ó 70°; 80° y 90°C) resulta un n de 6 (Labuza y Kamman, 1983). Se utilizó también un nivel de confianza del 95% (Apéndice 1).

### 3.6. REACTIVOS UTILIZADOS

Todas las drogas utilizadas fueron de calidad analítica y pertenecientes a las siguientes firmas:

Merck Química Argentina: 2,6 diclorofenolindofenol, Xileno, ácido oxálico, glucosa, sacarosa, sorbitol, ácido L-ascórbico, ácido ortofosfórico, ácido acético glacial, acetato de sodio, L-lisina, soluciones reguladoras patrones.

Sintorgan S.A. (Argentina): Xileno, formaldehído (40%), Agua oxigenada (30%).

Carlo Erba (Montedison, Italia): Soluciones reguladoras patrones, pH 7,00 y 4,00.

Mallinckrodt: Acido cítrico, cloruro de estaño (II) dihidrato, bisulfito de sodio.

BDH (Inglaterra): Acido metafosfórico, ácido propiónico.

Fluka (Suiza): Acido metafosfórico.

Sigma Chemical Co. (U.S.A.): Acido deshidroascórbico, sorbato de potasio.

Mattheson (USA): Gas sulfuro de hidrógeno.

La Oxígena S.A. (Argentina): Gas nitrógeno, libre de oxígeno, calidad SS.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

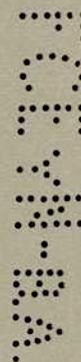
**Destrucción de vitamina C en  
sistemas modelo de actividad acuosa  
reducida**

**Ana María Luisa Rojas**

Tesis presentada para optar al  
Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Directora de tesis: *Dra. Lía Noemí Gerschenson*

**1995**



#2771  
h2  
pte 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

**Dstrucción de vitamina C en  
sistemas modelo de actividad acuosa  
reducida**

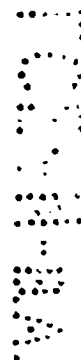
**Ana María Luisa Rojas**

**Tesis presentada para optar al  
Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**Directora de tesis: *Dra. Lía Noemí Gerschenson***

**1995**

4<sup>2</sup>  
pte 2



**PARTE II**

## 4 - RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente trabajo, con el objeto de considerar el **efecto del oxígeno** durante el estudio cinético de cada sistema modelo, se siguió también la evolución en el tiempo de dicho factor. Se observó que la concentración inicial del mismo a tiempo cero es variable, pero está acotada a valores entre 1,2 y 4,5 ppm, resultando ser este el oxígeno incorporado durante la preparación de la solución modelo a 25°C. Estos resultados se observan en la Tabla 12.

**Tabla 12. Concentración inicial de oxígeno en cada sistema modelo.**

Sistema	Solubilidad a 25°C (ppm) (1)	Concentración leída a 25°C (ppm)	Concentración corregida a 25°C (ppm) (2)
A	4,7	4,1(3)	2,3
D	--(4)	3,3	--(4)
E	3,3	3,0	1,2
K	8,5	4,5	4,5

(1) Sadler y col. (1988).

(2) La forma de cálculo se explicó en el ítem 3.3.4, de "Materiales y Métodos".

(3) Valor medio.

(4) No se dispone de esta información.

Esta concentración inicial cae en todos los casos a valores no mayores a 0,20-0,40 ppm en las 10 a 20 primeras horas de almacenamiento del sistema a las altas temperaturas (70° a 90°C) y en los primeros 5 a 15-25 días de almacenamiento a las bajas temperaturas (24° a 45°C). Estos valores alcanzados son del orden del error de lectura del aparato de medición del oxígeno disuelto y en realidad

aparato de medición del oxígeno disuelto y en realidad reflejarían el agotamiento del gas en la solución. A modo de ejemplo se muestran en las figuras 36 a 39 las variaciones del oxígeno a lo largo del tiempo, en algunos de los sistemas estudiados. En concordancia con el perfil evolutivo del oxígeno disuelto en función del tiempo, en algunos casos se pudo detectar que existe una más rápida pérdida inicial de ácido L-(+)-ascórbico (AAs), la que luego continúa con una velocidad constante y menor que la inicial. La evolución de la concentración de oxígeno disuelto en los sistemas modelo envasados sin cámara de aire o espacio de cabeza, (Figs. 36 a 39) haría pensar que, inicialmente, la vía predominante de destrucción sería la aeróbica, la cual es más rápida y ocurriría hasta agotar el exceso de oxígeno disuelto inicialmente.

En muchas circunstancias prácticas el oxígeno esta presente en cantidades limitadas y su concentración varía durante el almacenamiento del producto. Varios autores observaron, en dichos casos, una pérdida más rápida de AAs al principio del almacenamiento. Así ocurrió en estudios de retención de este ácido efectuados en jugo de toronja (grapefruit) enlatado comercialmente (Smoot y Nagy, 1980), en jugo de naranja envasado con igual metodo (Nagy y Smoot, 1977), en jugo de naranja reconstituído y almacenado a 4°C y a 20°C dentro de cajas de cartón laminado con plástico, con y sin espacio de cabeza, durante 5 meses, y también en botellas de vidrio (Wartenberg, 1982). Robertson y Samaniego (1986) determinaron el efecto de diferentes concentraciones iniciales de oxígeno disuelto sobre los cambios de calidad en el jugo de limón durante el almacenamiento a 36°C. Trabajaron con concentraciones iniciales de oxígeno disuelto de 0,41 ppm; 1,44 ppm y 3,74 ppm y observaron su rápida desaparición hasta niveles de 0,12 a 0,15 ppm, las que se mantuvieron aproximadamente constante durante el resto del almacenamiento. La pérdida de AAs fue ligeramente más rápida en los primeros 3 días para las concentraciones más altas de oxígeno disuelto inicial.

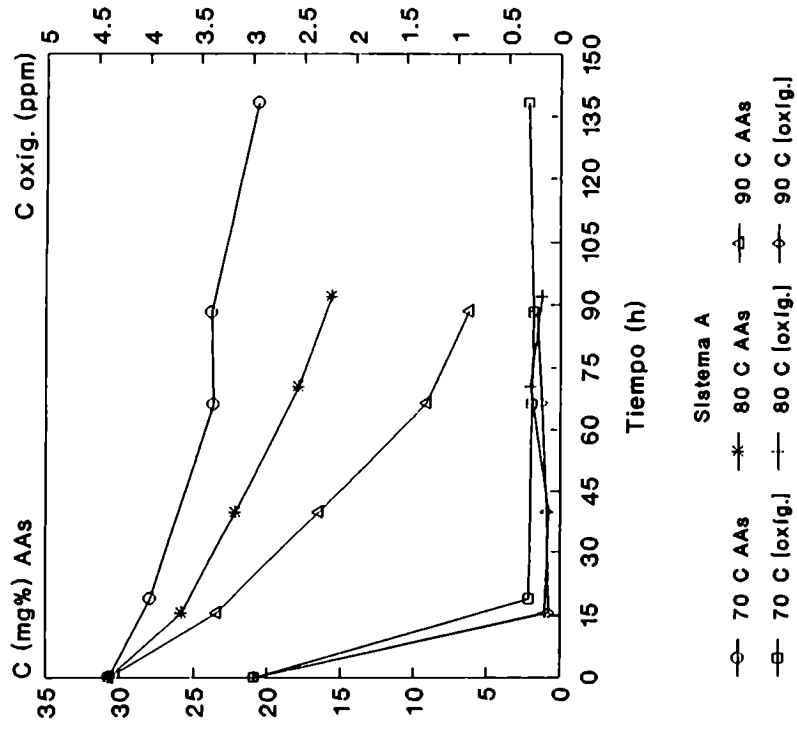


Fig. 37- Perfiles de destrucción del AAs y de evolución de la concentración de oxígeno disuelto (corregida a 25 C)

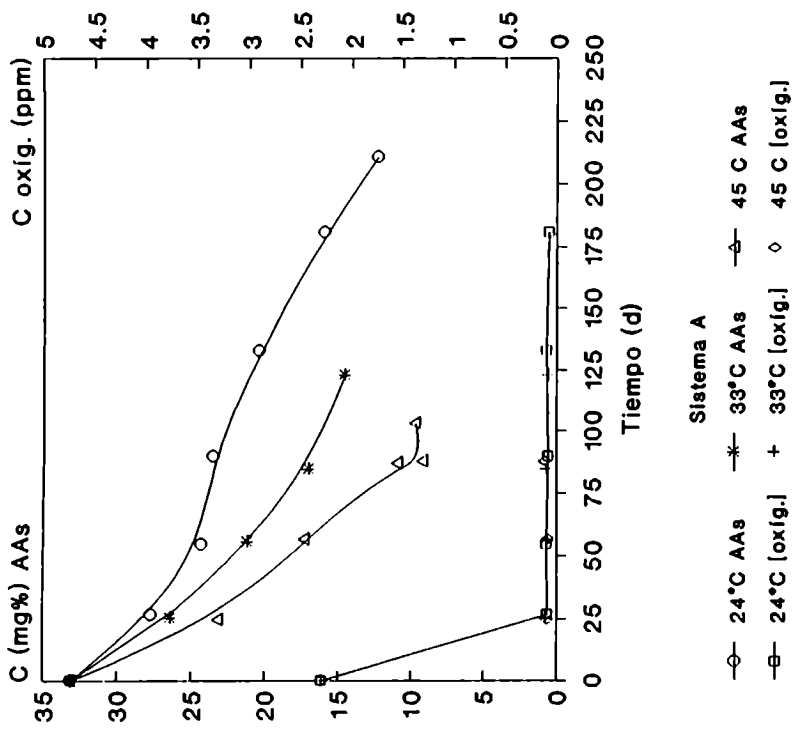


Fig. 36- Perfiles de destrucción del AAs y de evolución de la concentración de oxígeno disuelto (corregida a 25 C)

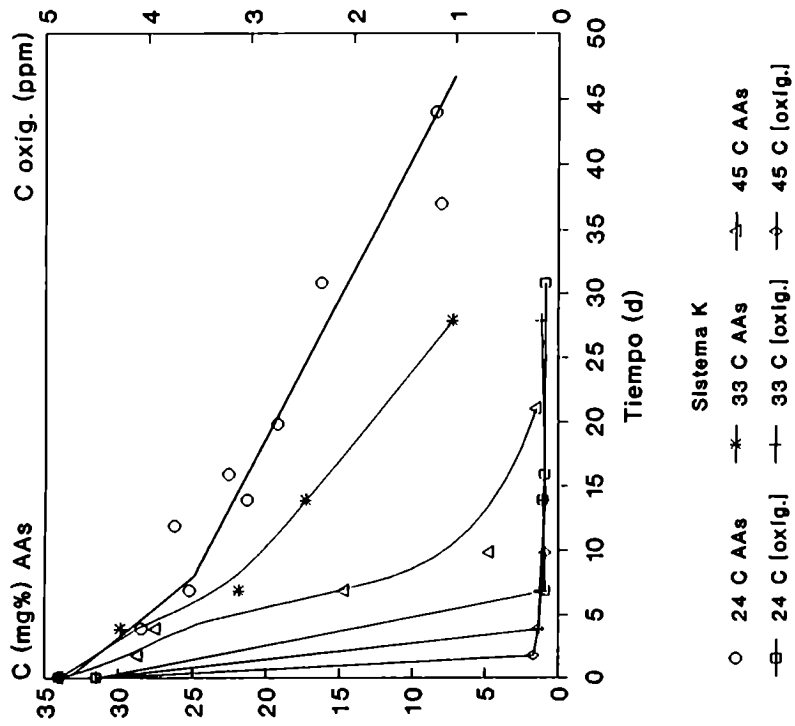


Fig. 38- Perfilles de destrucción del AAs y de evolución de la concentración de oxígeno disuelto (corregida a 25 C)

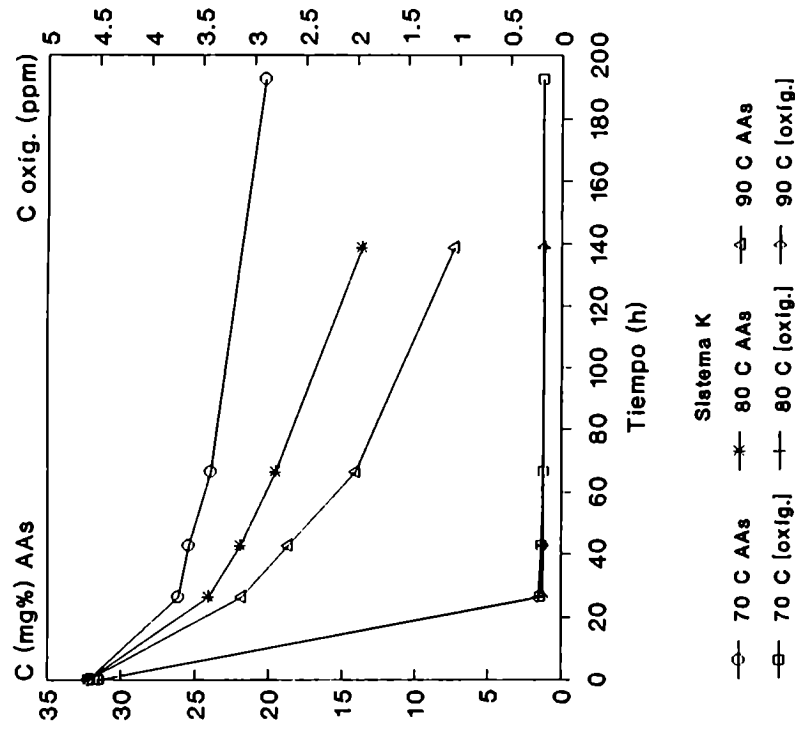


Fig. 39- Perfilles de destrucción del AAs y de evolución de la concentración de oxígeno disuelto (corregida a 25 C)



A posteriori, las diferencias no fueron significativas en los 42 días de almacenamiento, ocurriendo únicamente la vía anaeróbica una vez agotado el oxígeno. Estos autores realizaron el envasado en recipientes de vidrio herméticamente cerrados y sin espacio de cabeza. Esto significaría que la pérdida de AAs durante los primeros días de tratamiento térmico es debida al oxígeno incorporado durante la preparación del sistema. Huelin (1953) destacó también esta situación en su estudio de la destrucción de AAs en jugo de naranja enlatado según el procedimiento comercial. Por ello, en los primeros estadíos de la destrucción del nutriente se observa la aparición de ácido deshidroascórbico (DHA) como consecuencia de la rápida destrucción oxidativa inicial del primero.

Por todo lo antedicho, en el presente trabajo, para hallar el orden de reacción y para el cálculo de las constantes de la **velocidad de destrucción del AAs**, en los sistemas modelo envasados sin espacio de cabeza **no se incluyó la información de concentración de AAs inicial** (medida a tiempo cero) sino que se consideraron sólo el resto de los puntos, los cuales responderían a una misma forma o mecanismo de destrucción predominante, esto es, el **mecanismo anaeróbico de degradación**.

Según estas consideraciones previas, se aplicaron los métodos explicados en el ítem 3.5 a los resultados obtenidos para la destrucción del AAs en función del tiempo. Resultó que ajustaron estadísticamente a una cinética de orden uno respecto de la concentración de este ácido, excepto en el sistema F (con L-lisina), donde los resultados ajustaron estadísticamente a una cinética de orden cero. A veces, la destrucción del AAs a lo largo de la experiencia fue menor al 50%, hecho que incrementó la inseguridad en la determinación del orden de la reacción (Labuza y Riboh, 1982).

Lee y col. (1977) estudiaron la destrucción del AAs en condiciones anaeróbicas, en jugo de tomate. Ellos concluyeron

que la cinética de dicha degradación a 37,8°C responde a un orden uno y que se ve afectada, durante los 20 primeros días de almacenamiento, por las trazas de oxígeno inicialmente disuelto. Este sería el responsable de la separación de la ordenada al origen de la recta de ajuste calculada, con respecto a la concentración inicial real de AAs cuando se realiza el ajuste de los resultados considerando también los datos iniciales.

Muchos autores, al igual que nosotros, determinaron que la pérdida de AAs en alimentos se produce, en general, según una cinética de primer orden respecto de la concentración del mismo. Esto ocurriría tanto en alimentos deshidratados como en aquéllos de elevada actividad de agua (Nagy y col., 1977; Lee y col., 1977; Kirk y col., 1977; Kincal y col., 1987; Pino y col., 1981). Sin embargo, según Dennison y col. (1978) este orden de reacción sólo sería válido en ausencia de oxígeno (anaerobiosis) o en abundancia del mismo (aerobiosis). Singh (1976) y Lin y Agalloco (1979) propusieron que con concentraciones de oxígeno disuelto limitantes, la pérdida de AAs dependería de su propia concentración así como de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción.

Cuando se analizó la relación de las constantes de velocidad de destrucción del AAs con la temperatura se comprobó una dependencia de tipo Arrhenius (Apéndice 2).

En este trabajo de investigación, también se determinó la **velocidad de pardeamiento no enzimático (PNE)** de cada sistema modelo simultáneamente a la de destrucción de la vitamina C. Para ello se midió a cada tiempo de análisis la absorbancia del sistema a 420 nm de longitud de onda. Se eligió este procedimiento por tratarse de un sistema transparente, que permitía así efectuar el seguimiento del pardeamiento en forma directa. Es de destacar que en los sistemas estudiados se forman, como consecuencia del tratamiento térmico, productos cuyas moléculas tienen muchas insaturaciones altamente conjugadas y con heteroátomos

(oxígeno, nitrógeno) que participan de aquéllas a través de sus electrones n, provocando el corrimiento de los máximos de absorción originales de cada sistema hacia la zona del espectro visible. O sea que a una longitud de onda de entre 400 y 500 nm presentan máximos de absorción distintos pigmentos o agentes cromóforos resultantes del PNE.

Se debe destacar que en varios de los sistemas estudiados y almacenados entre 24° y 45°C, apareció un período inicial durante el cual no existió pardeamiento detectable, al que usualmente se llama período de inducción o período "lag". Esta etapa es la fase inicial, previa a la etapa de pardeamiento propiamente dicho, en la cual aparecerán productos que presentan fluorescencia y nos referiremos a ella más adelante. Según Hodge (1953) este período correspondería a una prolongación de la etapa durante la cual se forman reductonas, las que tienen "per se" poder antioxidante. Cabe destacar que según Lamden y Harris (1949), el AAs en sí mismo es una reductona y retrasa la aparición de los productos coloreados cuando está presente en concentraciones menores a 5 - 10 mg%. En estos casos donde existió un período de inducción, la velocidad de PNE se calculó a partir de la finalización del mismo.

Se observó, en general, que la absorbancia del sistema medida a 420 nm presentó una dependencia lineal con el tiempo, o sea que la velocidad de aumento de la misma sería de orden cero respecto a la absorbancia:

$$+ \frac{dA}{dt} = k \cdot A^0$$

$$dA = k \cdot dt$$

$$A = A_0 + k \cdot t$$

donde: A: absorbancia a tiempo t.  
A<sub>0</sub>: absorbancia inicial del sistema modelo.  
k: constante de velocidad de PNE.  
t: tiempo.

Considerando que el pH podía influir en la variación de la vitamina C con el tiempo (Finholt y col., 1963; Singh y col., 1948) y dado que los sistemas modelo utilizados no involucraban el uso de sistemas tampón o buffer con capacidad reguladora, **se estudió la variación del pH** de los mismos a lo largo del almacenamiento.

El pH afecta la destrucción del AAs, la reactividad de los azúcares, la concentración de formas reactivas de amino-compuestos y la hidrólisis de di y polisacaridos (lo que puede generar grupos reactivos) (Finholt y col., 1963; Mathews y Jackson, 1933; Singh y col., 1948; Buera y col., 1987).

De la determinación (a temperatura ambiente) de la variación del pH del sistema con el tiempo de almacenamiento a las distintas temperaturas, se observó que aquél aumentaba ligera y paulatinamente, con un cambio de pH no mayor a +0,30 unidades de pH respecto del valor inicial. El aumento de pH observado se debería a la desaparición del AAs y de otros ácidos del medio (sórbito o propiónico, cítrico o fosfórico) como consecuencia de su destrucción. Los mismos humectantes presentan débil acidez y podría así su desaparición por reacción química afectar la acidez del medio (The Merck Index, 1983; Michaelis y Rona, 1913).

En los sistemas con sacarosa (E) y con glucosa y L-lisina (F), estudiados a altas temperaturas, se observó una disminución del pH, aunque no mayor a 0,20 unidades respecto del valor inicial. En el sistema con aminoácido (F) se observó una disminución de pH por la desaparición de los grupos amino del medio (Spark, 1969) pero menor a la que sería dable esperar. Probablemente, la presencia de ácidos débiles con leve capacidad reguladora así como la desaparición simultánea del AAs, cítrico y sórbito determinen ello.

En el caso del sistema con sacarosa (E), la pequeña acidificación observada a lo largo del tratamiento se debería a los productos de la caramelización de uno de los dos azúcares resultantes de la hidrólisis de la sacarosa: la

fructosa. Entre ellos se contarían los ácidos acético, fórmico, levulínico y el furfural, según Shaw y col. (1967).

Debe considerarse, entonces, que los resultados obtenidos están afectados por una leve variación de pH a lo largo de la experiencia.

El estudio de la variación de la actividad acuosa ( $a_w$ ), permitió ver que esta se mantenía prácticamente sin variantes que pudieran considerarse significativas, incluso en el sistema que contenía sacarosa, pasible de hidrólisis.

Se debe destacar que el pH y la actividad acuosa se evaluaron a 25°C. Todas estas características iniciales de los sistemas estudiados se modifican a sus valores correspondientes a la temperatura de procesamiento (70°-90°C) o de almacenamiento (24°- 45°C) a las que se trataron los sistemas, según el caso (Labuza y Riboh, 1982). Esto ocurre porque varían con la temperatura propiedades tales como la constante de disociación del agua, la solubilidad de los diferentes componentes, la constante dieléctrica del medio, la presión de vapor, etc.

Sólo unos pocos investigadores han realizado estudios de estabilidad de AAs total o vitamina C (Mokady y col., 1984; Smoot y Nagy, 1980; Nagy y Smooth, 1977; Wills y col., 1984) ya que la mayoría de los investigadores centraron su atención en el AAs.

Debido a la carencia de datos sobre estabilidad del AAs total o vitamina C (AAsT) en jugos concentrados y/o en alimentos dulces de  $a_w$  controlada, en condiciones experimentales cercanas a las reales, se decidió abordar en este trabajo dicho tópico. Es bien sabido que en los alimentos naturales, sólo un pequeño porcentaje del AAs total se encuentra como DHA (Wills y col., 1984) incluso algunos autores (Loeffler, 1941) suponen que el mismo es un artefacto de la extracción, previa al dosaje. Sin embargo, en el manipuleo de los alimentos industrializados, puede formarse éste a expensas del AAs y del oxígeno atmosférico, o de aquél solubilizado en el alimento, cuando el envasado se hace en

ausencia de cámara de aire. Por ejemplo, en nuestro trabajo, en los casos de almacenamiento en anaerobiosis, el oxígeno disuelto en los sistemas modelo líquidos determinó la existencia de una corta fase aeróbica como se comentó anteriormente; la misma concluyó dando lugar a la etapa anaeróbica, una vez agotado el oxígeno.

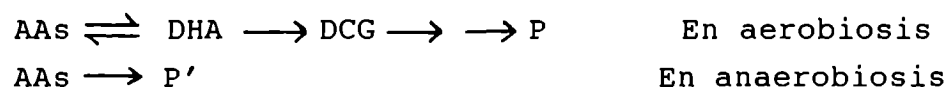
Como ya fuera definido, la **vitamina C (o AAs total)** resulta de:

$$C_{AAs\ total} = C_{AAs} + C_{DHA}$$

donde:  $C_{DHA}$  = concentración de AAs que se transformó en DHA, a tiempo t.

$C_{AAs}$  = concentración de AAs (como tal) a tiempo t.

por lo que la concentración y, por lo tanto, la cinética de destrucción del AAs total están condicionadas por la cinética de desaparición del AAs y por la de formación y desaparición del DHA:



donde P y P': productos.

En consecuencia, el resultado es la manifestación de una cinética compleja.

Debido a la complejidad de las reacciones involucradas el análisis de los datos obtenidos no fue simple, observándose que, en algunos casos, los datos no ajustaban a una cinética de orden cero o uno respecto de la concentración de AAs total, que son las reportadas en bibliografía (Mokady y col., 1984; Nagy y Smooth, 1977). Se probó estadísticamente el ajuste de las constantes de velocidad obtenidas a una dependencia de tipo Arrhenius con la temperatura, observándose que no siempre dicho ajuste se cumplía. En los casos en los que tal cosa sí ocurrió, se

calculó la energía de activación, observándose que, en general, su valor era semejante al obtenido para la destrucción del AAs en el mismo sistema.

Al destruirse la vitamina C, tanto el AAs como el DHA pueden dar lugar al PNE. Se sabe que el DHA puede entrar en la reacción de pardeamiento por ser un compuesto  $\alpha$ -dicarbo-nílico, altamente reactivo (Handwerk y Coleman, 1988).

En base a los datos de AAs y de AAs total (vitamina C), se determinó para cada tiempo la concentración de DHA (expresado como ácido L-ascórbico):

$$C_{DHA} = C_{AAs\ total} - C_{AAs}$$

En los sistemas envasados sin espacio de cabeza, la concentración de DHA en función del tiempo aumenta en un principio, a partir de una concentración inicial nula hasta alcanzar una concentración máxima que es variable con las condiciones y temperatura de tratamiento y con la composición del sistema. Luego de alcanzar este máximo, la concentración del DHA, en general, se mantiene aproximadamente constante o va disminuyendo lentamente en el lapso estudiado.

Si se considera que el oxígeno se agota rápidamente, al proceder la conversión de DHA a 2,3-DCG, debería disminuir la concentración del primero. Probablemente la precitada reacción no se vea muy favorecida al pH de trabajo (3,5) ya que como establecieron Borsook y col. (1937), recién a pHs mayores de 4 ocurre una conversión significativa o detectable de DHA a DCG. En nuestro caso, esta conversión no se detectó como importante ni siquiera a pH 5,0, pero debe recordarse que la técnica analítica utilizada tiene un error de aproximadamente 7%, lo cual no permitiría detectar variaciones pequeñas de la concentración. De todas maneras, es necesario destacar que esto ha de ser así, pues en muchos de los sistemas modelo estudiados, cuando la concentración de AAs residual había ya alcanzado niveles muy bajos, la concentración de DHA existente era semejante o aún mayor que aquélla. Esto pone a la vez de manifiesto la necesidad de

conocer la concentración de AAsT como indicador de la actividad de vitamina C real existente en un alimento.

#### 4.1. EFECTO DEL pH

##### 4.1.1. Acido ascórbico

Como ya fuera oportunamente destacado, el AAs es un ácido débil y, por lo tanto, la composición relativa de las formas de ionización posibles ( $AH_2$ ,  $AH^-$ ,  $A^-$ ) dependerá del pH del medio de reacción.

En el presente trabajo se encontró que el aumento del pH entre 3,5 y 5,0 en un sistema conteniendo glucosa y usando ácido cítrico como acidificante, acelera significativamente la velocidad de destrucción anaeróbica del AAs a 80° y 90°C, como puede verse en la Tabla 13.

**Tabla 13. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb) .10 <sup>3</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,5 ± 0,4	25 ± 3
	80	6,6 ± 0,1 A	
	90	18,6 ± 0,7 B	
B (Gluc./4,1)	70	3,2 ± 0,2	27 ± 2
	80	11,4 ± 0,7 A	
	90	30,2 ± 0,2 B	
C (Gluc./5,0)	70	2,8 ± 0,3	35 ± 4
	80	13,7 ± 0,8 A	
	90	49,5 ± 5,2 B	

k: velocidad específica

sb: desviación estándar

Ea: energía de activación

k y Ea con igual letra significa que son significativamente diferentes (P: 0,95)

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura.



Lee y col. (1977) estudiaron la destrucción de la vitamina C en jugo de tomate enlatado, en función de la temperatura de almacenamiento, pH y concentración de cobre. Habiendo ensayado pHs de 3,53; 3,78; 4,06 y 4,36, ellos observaron que el AAs se destruye a velocidad máxima a pH 4,06, el que resulta aproximadamente igual al  $pK_a$  del AAs a 37,8°C que fue la temperatura de trabajo. Dennison y Kirk (1978) llegaron a análogas conclusiones. Estos autores atribuyen sus resultados a la relación iónica presente cuando el pH es igual al  $pK_a$ . Finholt y col. (1963) sostienen que, cuando se cumple esta condición y estando presente un 50% de forma no disociada ( $AH_2$ ) y un 50% de la forma monoiónica ( $AH^-$ ), sería más probable la formación de un dímero ( $AH_2 \cdot AH^-$ ), el cual sería la forma indispensable para la destrucción anaeróbica del AAs, como fuera ya comentado en la "Introducción" de este trabajo.

Huelin (1953) estudió la retención de AAs en soluciones acuosas del mismo en un buffer citrato - fosfato y en atmósfera de nitrógeno (anaerobiosis). Observó que a 30°; 40° y 100°C hay mayor velocidad de destrucción a pHs entre 3,0 y 4,0, mientras que en soluciones azucaradas, el máximo de degradación ocurre a pH 4,0.

En nuestro trabajo no se encontró un máximo de destrucción del AAs a pH cercano a 4,0. Probablemente, la presencia simultánea de un azúcar como la glucosa en alta concentración (36% P/P) junto con el AAs, modifica el medio de tal modo que otras reacciones influyen fuertemente en la velocidad de pérdida del AAs. Así no sólo las reacciones químicas propias que llevan a la destrucción del nutriente sino también aquéllas que llevan al PNE del sistema, derivadas de las primeras y de la destrucción de la glucosa, van a influir en la degradación estudiada. Es de notar, asimismo, que la constante de disociación ácida del AAs, también se ve afectada por la composición del medio y, en consecuencia, nunca tendrá el mismo valor que en agua pura.

En un trabajo realizado en 1964 por Clegg, se vinculó la destrucción del AAs con el PNE del sistema. En él se determinó que el pardeamiento del jugo de limón almacenado a 37°C durante 5 y 21 días es máximo a pH 4,5 y mínimo a 2,2, que es el pH natural del jugo de limón, determinando ello, según Clegg, una mayor retención del AAs a los menores pHs.

Como se observa en la Tabla 14, el PNE de los sistemas estudiados por nosotros, en general, aumenta con el pH a las altas temperaturas, si bien a 70°C, es necesario un salto de 1,5 unidades de pH para observar esta tendencia.

**Tabla 14. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb) . 10 <sup>4</sup> (UAb/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,3 ± 0,2 A	34 ± 2
	80	10,2 ± 0,5 C	
	90	38,7 ± 0,4 D	
B (Gluc./4,1)	70	2,6 ± 0,4 B	41 ± 5
	80	18,3 ± 2,1 C	
	90	75,2 ± 8,5 D	
C (Gluc./5,0)	70	12,1 ± 2,5 AB	35 ± 6
	80	129,0 ± 4,5 C	
	90	203,3 ± 35,7 D	

k: velocidad específica

sb: desviación estándar

Ea: energía de activación

k y Ea con igual letra significa que son significativamente diferentes (P: 0,95)

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura.

UAb/h: unidades de absorbancia por hora.

Con el objeto de determinar el grado de contribución del AAs al pardeamiento de cada sistema, se realizó un análisis de absorbancia a 420 nm de longitud de onda en función del tiempo, de todos los sistemas modelo preparados esta vez **con y sin el agregado de AAs**, tal como fuera indicado en el ítem 3.4. El resultado de este estudio se observa en la Tabla 15.

**Tabla 15. Pardeamiento no enzimático de los sistemas modelo. Estudio realizado a 80°C sin y con el agregado de ácido L-ascórbico.**

\* Absorbancia (420 nm) = f(tpo.)

SISTEMAS MODELO	Sin AAs	Con AAs	$\frac{k_{\text{con AAs}}}{k_{\text{sin AAs}}}$
	(k ± sb).10 <sup>4</sup> (UAb/h)	(k ± sb).10 <sup>4</sup> (UAb/h)	
Gluc/3,5 (A)	4,4 ± 0,3	10,2 ± 0,5	2,3
Gluc/4,1 (B)	12,0 ± 2,6	18,3 ± 3,9	1,5
Gluc/5,0 (C)	99,5 ± 6,1	129,0 ± 7,5	1,3
Sorbitol (D)	NDP	0,76 ± 0,17	---
Sacarosa (E)	121,6 ± 10,6	196,3 ± 33,6	1,6
Lisina (F)	252,0 ± 7,2	227,0 ± 6,5	0,9
Sn (II) (G)	5,5 ± 0,3	26,1 ± 2,0	4,7
Propiónico (H)	4,1 ± 0,3	13,6 ± 1,1	3,3
Fosfórico (I)	12,1 ± 1,0	30,9 ± 1,1	2,6
Bisulfito (J)	2,2 ± 0,2	9,6 ± 0,6	4,4
Control (K)	NDP	1,2 ± 0,1	---
Gluc/aire (A aer.)	21,7 ± 1,7	54,6 ± 4,8	2,5
Control/aire (K aer.)	NDP	24,2 ± 0,9	---

k: velocidad específica

sb: desviación estándar

UAb/h: unidades absorbancia/hora

NDP: no se detectó pardeamiento

Entre k (sin) y k (con) para cada uno de los sistemas D, F y K no existe diferencia significativa (P: 0,95)

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95):

Sin AAs: E > A > D = K

C > B > A

G > A

H = A

J < A

I >> A

F >>> A

A aer >> A

K aer = K

Con AAs: E > A > K = D

C > B > A

G > A

H = A

J = A

I >> A

F >>> A

A aer > A

K aer > K

En ella se ve que el aumento del pH de 3,5 a 5,0 en los sistemas conteniendo glucosa (A, B, C) aumenta la velocidad

del pardeamiento no enzimático en los sistemas sin y con agregado de AAs. Ello se debe a que al aumentar el pH aumenta la velocidad de pardeamiento en cada condición. En la precitada tabla se puede ver también que al aumentar el pH, disminuye la contribución del **agregado** de AAs a la velocidad de PNE ya que disminuyen los cocientes:

$$\frac{k_{\text{ con AAs}}}{k_{\text{ sin AAs}}}$$

Asimismo, se puede ver en la Tabla 15 que sin AAs:

$$\frac{k_{(B)}}{k_{(A)}} = 2,7$$

$$\frac{k_{(C)}}{k_{(A)}} = 22,6$$

y con AAs:

$$\frac{k_{(B)}}{k_{(A)}} = 1,8$$

$$\frac{k_{(C)}}{k_{(A)}} = 12,7$$

Ello nos muestra que el aumento del pH afecta considerablemente más al pardeamiento en ausencia de AAs. La presencia de AAs generó sistemas que ya no son tan sensibles al cambio de pH en cuanto al pardeamiento. Parecería existir una interacción entre ambas rutas de pardeamiento por el hecho de que el AAs, cuando se destruye (a pH 3,5) en ausencia de azúcares o de agentes humectantes portadores de carbonilos activos (sistemas D y K, Tabla 15), produce mucho menor pardeamiento que el que determina en los sistemas conteniendo glucosa.

Es de destacar que el ácido sórbico usado como conservador y el ácido cítrico usado como acidificante son activos en el pardeamiento pues son dadores de carbonilos que participan en dichas reacciones y algunos autores (Seow y Cheah, 1985) han reportado que incrementan el oscurecimiento

derivado de la caramelización de la aldohexosa. En nuestro caso, no se vio pardeamiento debido a ellos en ausencia de AAs y de humectantes (sistema K) ni en presencia de sorbitol (sistema D).

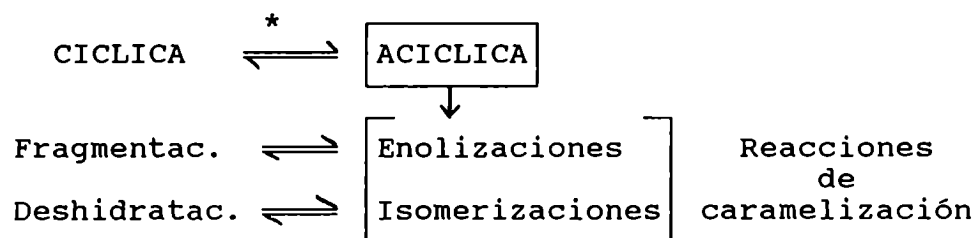
Para aclarar aún más la influencia del AAs en el pardeamiento observado, se muestra en la Tabla 16 la absorbancia a 420 nm para concentraciones fijas remanentes de AAs en los distintos sistemas a las distintas temperaturas estudiadas. También se muestran los tiempos necesarios para alcanzar dichas concentraciones y absorbancias. Las constantes específicas de destrucción del AAs y de desarrollo de PNE necesarias para confeccionar esta tabla, son las que se reportan a lo largo de este capítulo. En aquélla se observa que, para una misma concentración de AAs remanente, hay absorbancia significativamente creciente al aumentar el pH, lo cual se debe al aumento significativo de la velocidad de pardeamiento con el pH y, en particular, a la fuerte contribución de la glucosa. Se puede así observar en la Tabla 16 que, por ejemplo, a concentraciones remanentes de AAs de 10 mg% y 80°C, la absorbancia a 420 nm de los sistemas K y D es de 0,0218 - 0,0301 a las 201 - 290 horas, cuando la de aquél conteniendo glucosa a pH 3,5 es de 0,1650 a las 159 horas. Ello se debería a que el aumento del pH aumenta la velocidad de caramelización de la glucosa y la velocidad de destrucción del AAs, llevando a un aumento del pardeamiento no enzimático.

El hecho ya comentado de que el AAs exalte mucho más el pardeamiento en presencia de glucosa o sacarosa, que en el sistema control (K) o con sorbitol (D), requiere una explicación.

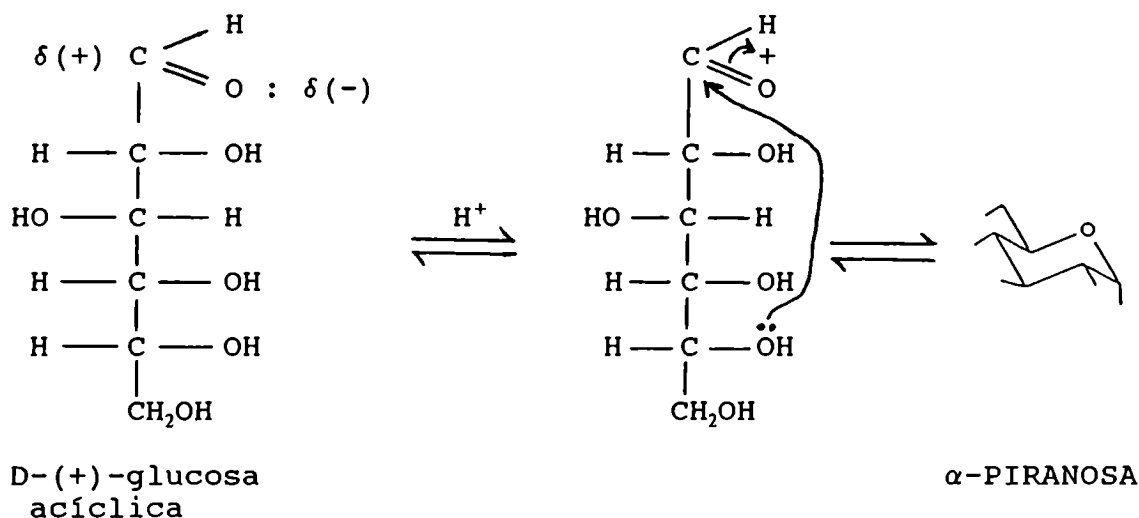
**Tabla 16. Pardeamiento no enzimático. Absorbancia del sistema modelo cuando se alcanza la concentración de ácido L-ascórbico indicada.**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Concentración de AAs (mg%)			Concentración de AAs (mg%)		
		25	20	10	25	20	10
		Tiempo (h) necesario para alcanzar X mg% de AAs			Absorbancia resultante (420 nm)		
A (Gluc/3,5)	70	59	150	432	0,0162	0,0375	0,1036
	80	21	55	159	0,0241	0,0585	0,1650
	90	14	26	63	0,0542	0,1008	0,2454
B (Gluc/4,1)	70	64	133	347	0,0154	0,0332	0,0886
	80	29	48	109	0,0418	0,0776	0,1889
	90	21	28	51	0,0992	0,1545	0,3264
C (Gluc/5,0)	70	55	134	381	0,0415	0,1375	0,4357
	80	28	44	95	0,1933	0,4037	1,0573
	90	22	27	41	0,2768	0,3684	0,6531
D (Sorbitol)	70	84	251	769	0,0026	0,0120	0,0411
	80	38	100	290	0,0111	0,0157	0,0301
	90	25	41	93	0,0074	0,0141	0,0350
E (Sacarosa)	70	50	78	167	0,1026	0,1674	0,3687
	80	23	30	53	0,1926	0,3342	0,7739
	90	10	14	25	0,1576	0,2764	0,6453
F (Lisina)	70	30	50	90	0,3368	0,7458	1,5638
	80	15	22	35	1,2565	1,8996	3,1858
	90	6	10	19	0,4459	0,9070	1,8292
K (Control)	70	50	198	659	0,0019	0,0092	0,0322
	80	18	62	201	0,0000	0,0050	0,0218
	90	11	34	105	0,0000	0,0021	0,0113

Para que se inicie la reacción de PNE es necesario que el azúcar activo mutarrote a la forma acíclica, que es la que participa en las reacciones de caramelización (Van Dam y col., 1986):



La formación de la estructura acíclica implica la movilización de 3 electrones y 3 protones del solvente (Labuza y Beiser, 1962). Esta primera etapa (\*) es muy importante y está desfavorecida en medio suficientemente ácido (pH 3,5 en este caso). El medio ácido favorece la adición nucleofílica en los grupos carbonilo de aldehídos y cetonas y, por lo tanto, se favorece en el caso de un azúcar, la formación del ciclo correspondiente:



Así, a pH 3,5, las pérdidas de glucosa debidas a las reacciones de PNE son menores al 3% - 5%, a actividades de agua entre 0,900 y 0,950 (Cerruti y col., 1985).

A pH 5,0 ya aumenta suficientemente el porcentaje de forma acíclica como para aumentar la velocidad de caramelización y por lo tanto se incrementa significativamente el PNE, a lo que se suma también la más rápida destrucción del AAs. Confirmando esto, se puede ver en la Fig. 40 como al aumentar el pH del sistema con glucosa desde 3,5 hasta 5,0, aumenta la velocidad de PNE a una dada temperatura a 80° y 90°C, y desde pH 4,1 hasta 5,0 a 70°C. Las velocidades de destrucción del AAs aumentan significativamente entre aquellos pHs sólo a 80° y 90°C, haciéndolo en menor grado de lo que lo hace el PNE. El AAs se destruye más lentamente al menor pH, pero la producción de un intermediario activo en el pardeamiento que es el furfural, es mayor a pH 3,5, disminuyendo considerablemente

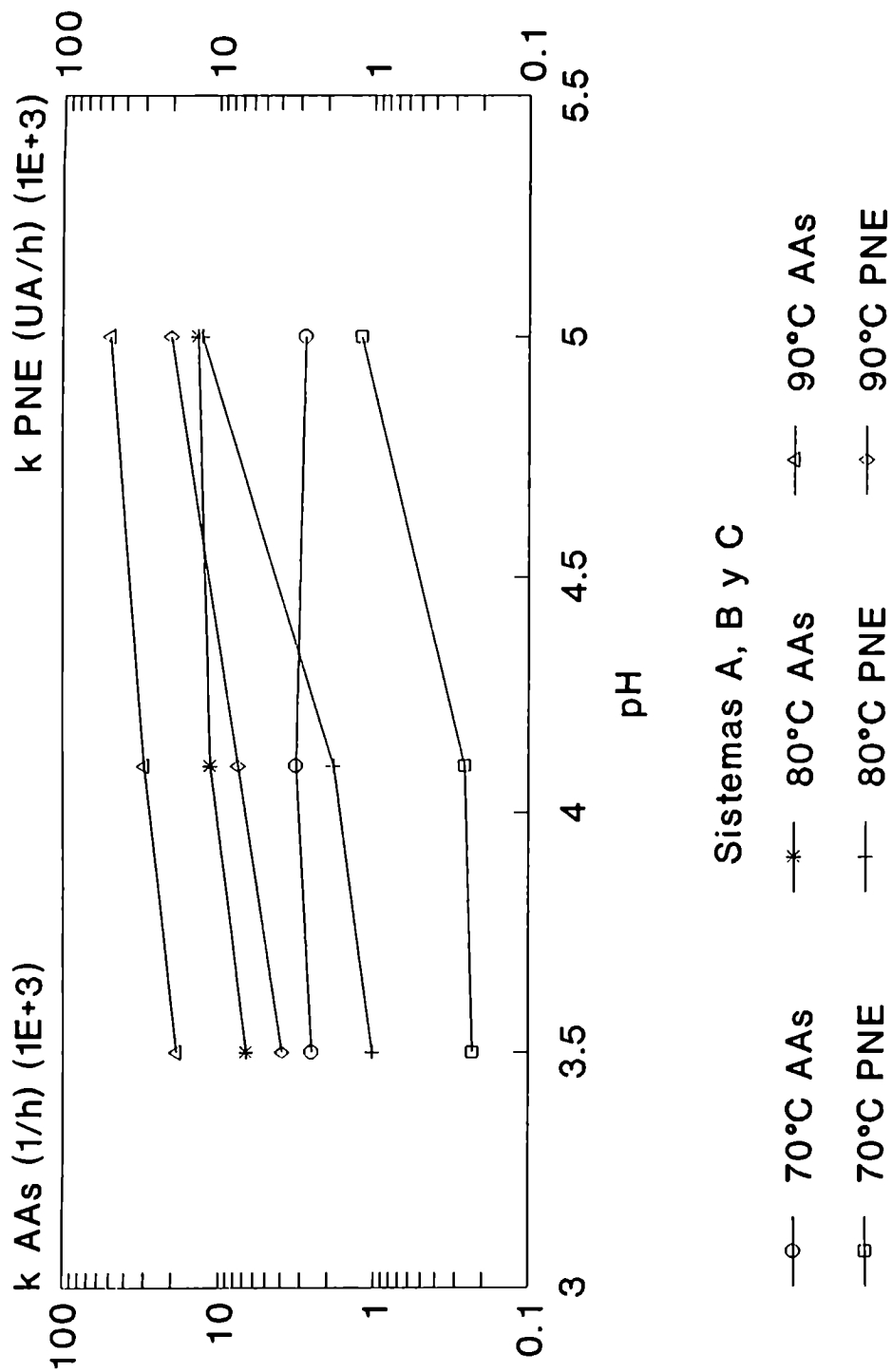


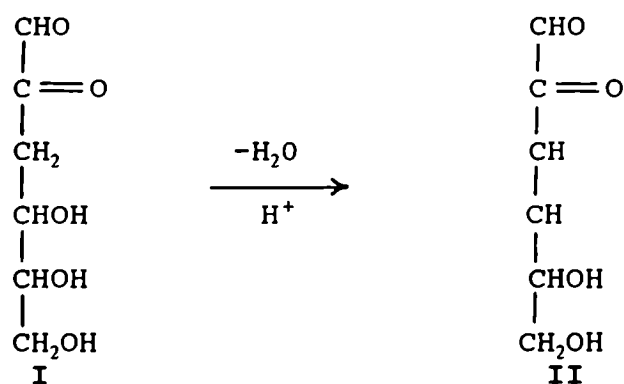
Fig. 40- Variación de la velocidad (k) de destrucción del AAs y del PNE con el pH del medio



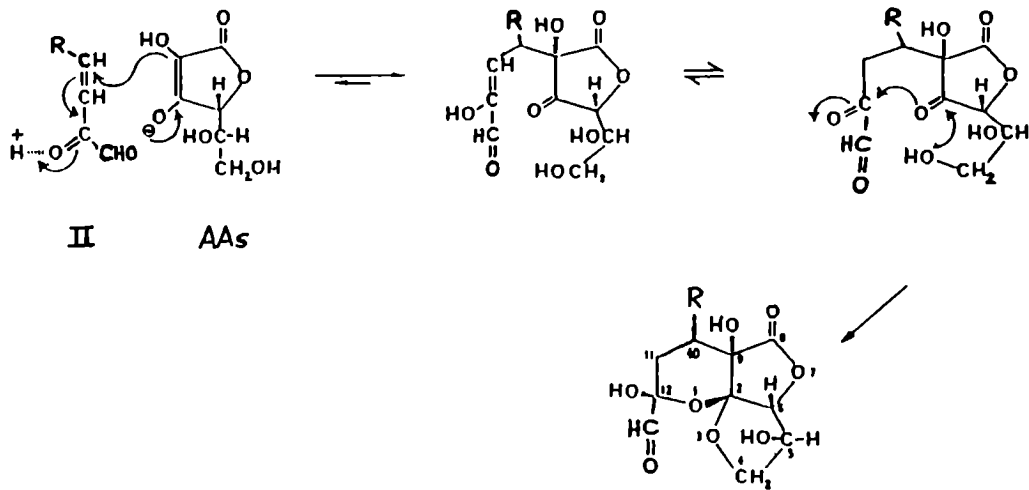
a pH 5,0 o mayores (Finholt y col., 1965b). Quizás por ello a pH 3,5, el AAs contribuye relativamente más al oscurecimiento que la glucosa, la que es especialmente estable a dicho pH.

A pH 5,0 la caramelización de la glucosa está favorecida y, por lo tanto, es considerablemente menor la contribución relativa que hace el AAs al pardeamiento global del sistema. Aún cuando éste se destruye más rápidamente a este pH, no hay formación considerable de furfural.

En condiciones anaeróbicas, el AAs sufre espontánea descarboxilación y deshidratación para formar 3-desoxi pentulosa (DP) y furfural (a pH más ácido) a través de un intermediario carbonílico  $\alpha,\beta$ -no saturado: 3,4-didesoxi-3-ene pentulosa (DDP) (Kurata y Sakurai, 1967). Por lo tanto, el AAs es fuente de carbonilos activos para el pardeamiento (Wedzicha, 1984). La presencia de azúcares del tipo hexosa produce desoxihexulosas y además el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) como intermediarios del pardeamiento de aquéllos. Probablemente, como el AAs al destruirse anaeróbicamente genera compuestos semejantes a los producidos durante la caramelización de la glucosa (por ejemplo, desoxisulosas muy activas en el pardeamiento), ambas vías de PNE pueden influenciarse mutuamente. Según Davies y Wedzicha (1994) el anión del AAs puede sufrir la adición por el mecanismo de Michael a un compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -no saturado, incorporándose así el AAs al polímero de melanoidinas. La glucosa, al caramelizarse, produce 3-desoxihexulosa (I) la cual puede deshidratarse (con catálisis ácida) dando el compuesto II (3,4-didesoxi hexulosa):



Ello requiere mayores temperaturas cuando no hay presentes aminoácidos (Wedzicha, 1984). En consecuencia, la adición de Michael puede proceder entre el compuesto II y el anión del AAs, según (Fodor y col., 1983):



De esta manera se explicaría la gran influencia del AAs en el pardeamiento del sistema en presencia de glucosa. Se trataría entonces de una interacción entre ambas rutas de PNE con un aumento consecuente del oscurecimiento. La sacarosa reaccionaría igual, previa hidrólisis. En nuestras experiencias, el aumento del pH no produjo diferencias significativas en las energías de activación de las reacciones de destrucción del AAs y de PNE (Tablas 13 y 14).

#### 4.1.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)

En la Tabla 17 se presentan los resultados para el ácido ascórbico total (AAsT) en los sistemas estudiados A, B y C, cuya composición está descripta en la Tabla 8, y que permite analizar el efecto del pH sobre la destrucción de la vitamina. Se observa que la destrucción presentó en general, una cinética de orden cero y un aumento significativo ( $P: 0,95$ ) de la constante de velocidad de destrucción del AAsT con la temperatura. Se comprobó además una dependencia de tipo Arrhenius con la temperatura para los sistemas B y C, resultando una energía de activación de 24 y 33 kcal/mol, las cuales no mostraron diferencias significativas ( $P: 0,95$ ) entre sí ni con las obtenidas al estudiar la destrucción del AAs.

Como se observa en la Tabla 17, el aumento de pH de 3,5 a 5,0 en los sistemas conteniendo glucosa fue diverso. A 70°C, el aumento del pH no produjo diferencias en las constantes de velocidad de destrucción del AAsT, según se observa en la Figura 41. Esto mismo se observó para el AAs (Tabla 13). A 80° y 90°C, las constantes de velocidad de destrucción del AAsT presentaron un aumento significativo ( $P: 0,95$ ) al ir de pH 3,5 a 4,1, pero no ocurre tal cosa entre 4,1 y 5,0. Cuando comentamos el efecto del pH en la destrucción del AAs, vimos que a 80° y 90°C, el aumento del pH entre 3,5 y 5,0 producía el incremento de la misma. Como se puede observar en los gráficos de las figuras 42, 43 y 44, el DHA muestra un perfil cinético semejante, para cada temperatura y a los tres pHs estudiados, alcanzando un máximo y luego manteniéndose constante por el efecto del agotamiento del oxígeno y/o del balance de su formación y su destrucción. Como se observa en las figuras 43 y 44, el DHA es menor, para tiempos mayores de 20 horas, a pH 5,0 que a pH 4,1. Conforme disminuye el pH parecería predominar la formación sobre la destrucción simultánea del DHA. Borsook y col. (1937) encontraron que la velocidad de destrucción del DHA a 2,3-diceto gulónico (DCG) era baja y se mantenía además constante

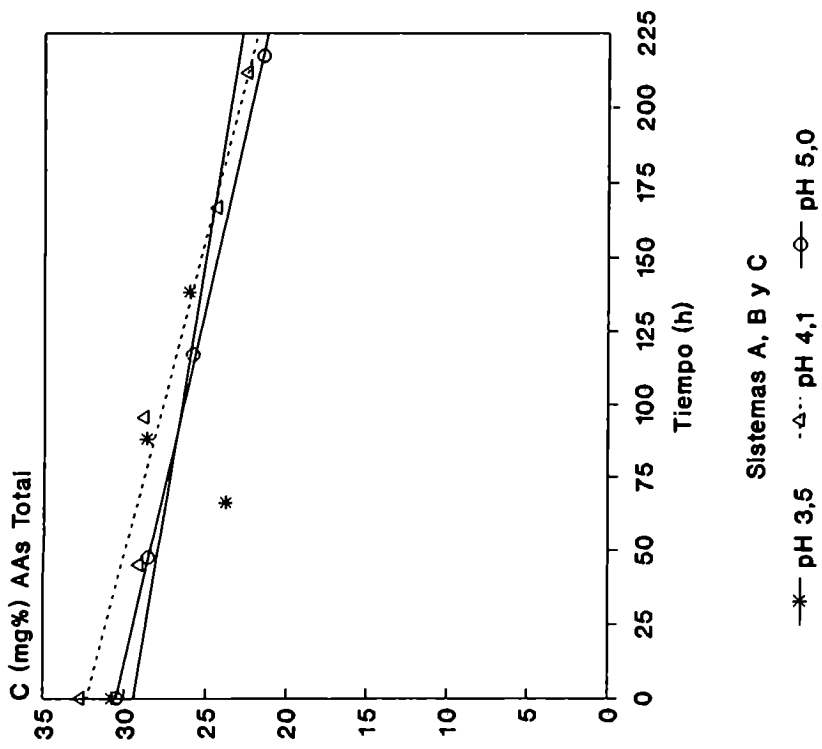


Fig. 41- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) en función del tiempo a 70 C

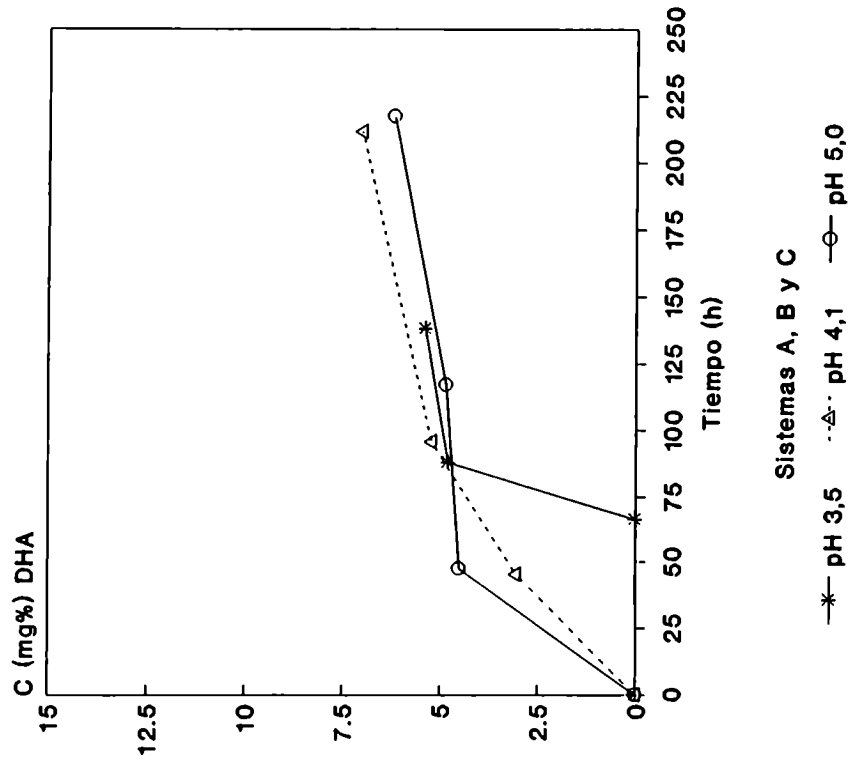


Fig. 42- Perfiles de destrucción del DHA en función del tiempo a 70 C

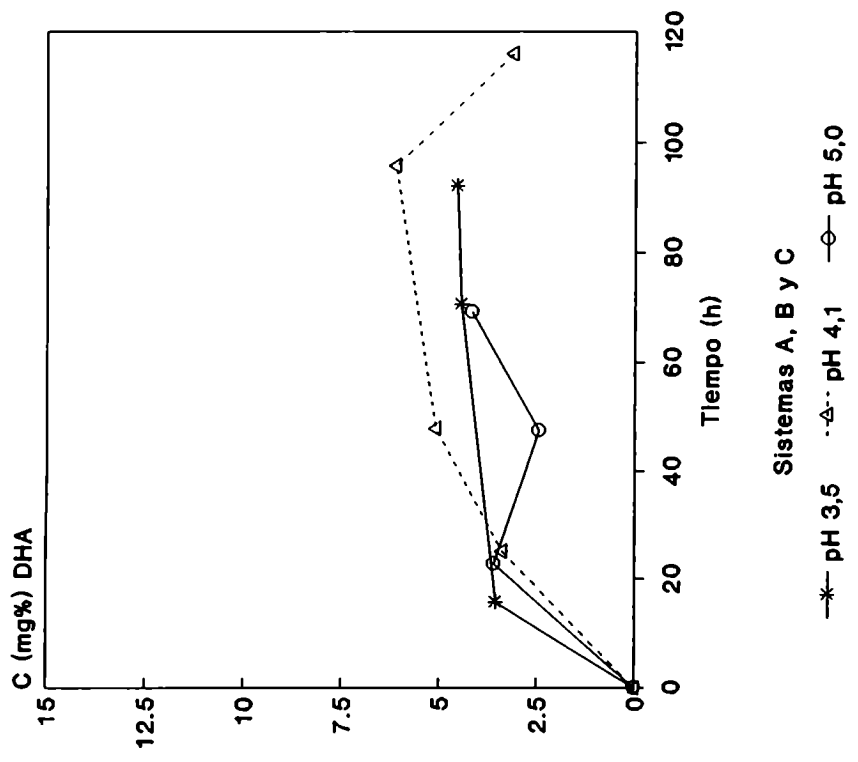


Fig. 43- Perfiles de destrucción del DHA en función del tiempo a 80 C

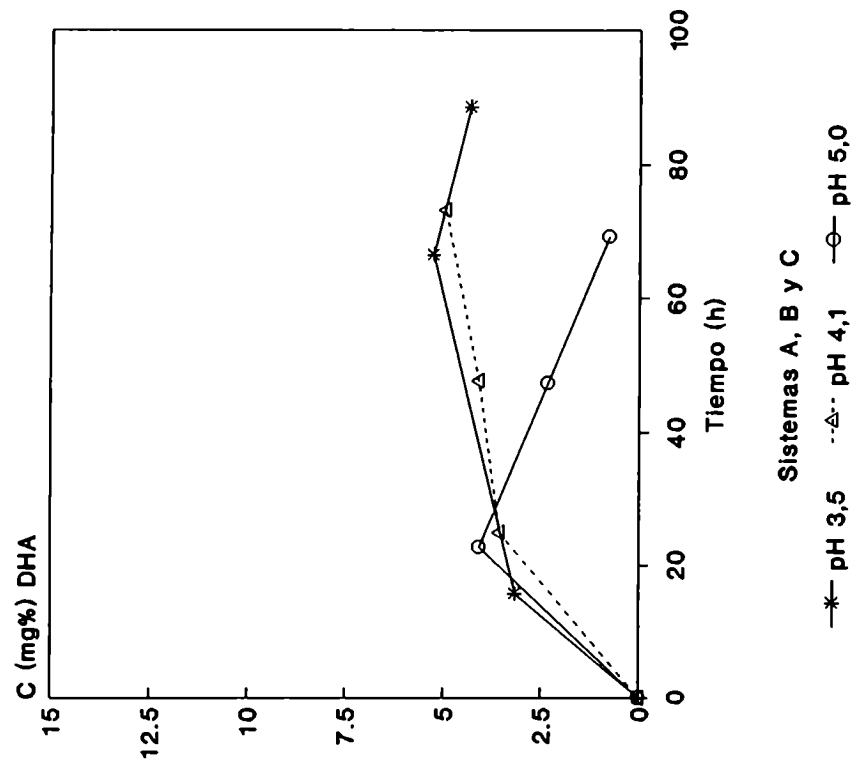


Fig. 44- Perfiles de destrucción del DHA en función del tiempo a 90 C

hasta un pH de 4,0, aumentando luego para pHs más básicos. Iguales resultados fueron obtenidos por Joslyn y Supplee (1949).

La tendencia mostrada por la destrucción del AAsT en función del pH a 90°C, se debería a la adición de los efectos del pH en la destrucción del AAs y en la formación-destrucción del DHA.

**Tabla 17. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb).10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	NR	mg%/h	29,5 ± 18,6	-- --
	80	0	mg%/h	119,1 ± 12,2 DF	
	90	0	mg%/h	197,7 ± 28,7 EG	
B (Gluc./4,1)	70	0	mg%/h	46,1 ± 5,6	24 ± 5
	80	0	mg%/h	174,7 ± 9,7 D	
	90	0	mg%/h	328,2 ± 22,3 E	
C (Gluc./5,0)	70	0	mg%/h	40,9 ± 7,5	33 ± 10
	80	0	mg%/h	168,9 ± 15,4 F	
	90	0	mg%/h	415,0 ± 45,2 G	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes

NR: no regresiona.

#### 4.2. EFECTO DEL AGENTE ACIDIFICANTE UTILIZADO

##### 4.2.1. Acido ascórbico

El ácido cítrico ha sido usado en alimentos por muchos años y es a menudo empleado como estándar de comparación para evaluar los efectos de otros acidificantes en varios productos alimenticios (Furia, 1975). El Código Alimentario Argentino (CAA) establece su uso con dicho fin.

numerosos productos naturales, siendo uno de los más importantes ácidos en la bioquímica de las células vivas de diferentes orígenes, por su intervención en el ciclo de Krebs durante la respiración celular aeróbica. Por esta causa se recurre a él como acidificante en la formulación de alimentos, en la mayoría de los casos. Sus mayores ventajas son su elevada solubilidad en agua, sus efectos favorables en el flavor y su potente acción quelante de iones metálicos.

El ácido y sus sales de sodio y de potasio se agregan a jugos de frutas, bebidas analcohólicas carbonatadas, a leche en polvo (como citrato de sodio), etc.

El ácido puede ser usado en la preparación de mayonesa y de salsas. El ácido cítrico y sus ésteres isopropílico y estearílico pueden usarse en margarinas. El citrato de calcio se usa en mermeladas y jaleas. Se lo prefiere como anión acompañante de cationes (oligoelementos o macroelementos) cuya presencia se necesita en fórmulas alimenticias.

Soluciones acuosas de ácido cítrico con gelatina, sal, AAs, glucosa y carragenatos han sido inyectadas en la carne como preservativo.

Por su acción quelante preserva al AAs, siendo entonces éste aprovechado como antioxidante natural. Mezclas de ácido cítrico y ácido eritórbito (ácido D-eritroascórbico) son usadas para demorar el PNE de bananas mezcladas (4:1) con azúcar (Furia, 1975).

El ácido cítrico es sinergista con antioxidantes empleados para inhibir la rancidez de alimentos ricos en grasas y/o aceites. Es usado también para prevenir la cristalización en la miel.

El ácido fosfórico es el único ácido inorgánico usado extensivamente como acidificante en alimentos, aunque en mucha menor escala que el anterior (Furia, 1975). Es utilizado en bebidas cola y en bebidas carbonatadas. Su uso está contemplado en el Código Alimentario Argentino. Las sales ácidas y el pirofosfato ácido de sodio se usan como ingredientes en polvos para hornear.

El ácido fosfórico es el acidulante menos costoso,

económicamente hablando. Es más fuerte como ácido que los ácidos orgánicos habitualmente usados, lográndose disminuir el pH con un mínimo volumen agregado.

En vista de la posibilidad de optar por distintos ácidos para una formulación alimenticia, se diseñó el sistema I en el cual se usó como acidificante el ácido fosfórico (Tabla 8). Se comparó entonces el efecto del ácido cítrico (sistema A) y el del ácido fosfórico (sistema I) usados para ajustar a un mismo pH (3,5) el sistema que contiene glucosa como humectante.

En las Tablas 18 y 19 se presentan los resultados del estudio de destrucción del AAs y del PNE concomitante, respectivamente. Para el sistema I se observa que, al aumentar la temperatura, aumentan significativamente la velocidad de degradación del nutriente, entre 70° y 90°C, y la velocidad de pardeamiento, entre 70° y 80°C, no existiendo diferencia significativa a 90°C. Esto último impidió calcular la energía de activación de la reacción. Comparando los resultados presentados en las Tablas 18 y 19, se concluye que la velocidad de PNE y la velocidad de destrucción del ácido ascórbico a 70° y 80°C son mayores cuando se usa ácido fosfórico para acidificar el medio que cuando se usa ácido cítrico. A una temperatura de 90°C, ya no se observa diferencia entre el tratamiento con ácido fosfórico y con ácido cítrico en lo que respecta a la estabilidad del AAs, quizás por lo elevado de la temperatura estudiada. El aceleramiento considerable de todos los procesos químicos haría, en este caso, perder las diferencias existentes a menor temperatura. Por el contrario, a 90°C se obtuvo menor velocidad de pardeamiento en presencia de ácido fosfórico. Analizando los resultados obtenidos al respecto y presentados en la Tabla 15, se ve que el ácido fosfórico acelera hasta 2,7 veces el pardeamiento debido a la caramelización de la glucosa, a 80°C (sistemas A e I, sin AAs). En presencia de AAs (sistema I, con AAs) el ácido fosfórico produce una velocidad de PNE que triplica la del sistema acidificado con



ácido cítrico (A con AAs). Evidentemente, la acidificación con ácido fosfórico hasta pH 3,5, aumenta en igual grado el pardeamiento por caramelización de la aldosa y el debido a la interacción AAs-glucosa.

**Tabla 18. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb).10 <sup>3</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,5 ± 0,4 A	25 ± 3
	80	6,6 ± 0,1 B	
	90	18,6 ± 0,7	
I (Fosfórico)	70	5,0 ± 0,3 A	18 ± 3
	80	10,0 ± 0,4 B	
	90	21,8 ± 1,4	

**Tabla 19. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb).10 <sup>4</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,3 ± 0,2 A	34 ± 2
	80	10,2 ± 0,5 B	
	90	38,7 ± 0,4 C	
I (Fosfórico)	70	5,8 ± 1,2 A	
	80	30,9 ± 1,1 B	
	90	29,4 ± 2,0 C	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

Finholt y col. (1963) encontraron que los buffers de fosfatos aumentan la velocidad de destrucción anaeróbica de la vitamina en medio ácido (pH < 6) respecto de las soluciones reguladoras de boratos y acetatos. Seaver y Kertesz (1946) ya habían observado el aumento del

Kertesz (1946) ya habían observado el aumento del pardeamiento por el agregado de fosfatos a soluciones acuosas de diferente composición contenidas en tubos de vidrio Pyrex y calentadas a bañomaría a 98°C. Joslyn y Miller (1949), en su estudio en aerobiosis y con trazas de Cu (II) y Fe (III), determinaron que aquellos ácidos que complejan a estos iones serían los que más protegen al AAs de su oxidación. Según esto, determinaron que el ácido cítrico sería más protector que el ácido fosfórico. Bobbio y col. (1973) demostraron el efecto acelerador del pardeamiento de los constituyentes químicos de los sistemas "buffers" usados para regular el pH: iones como citrato y fosfato. Así, la velocidad de pardeamiento dependería no sólo del pH al cual está regulada la solución, sino de la mezcla de sales, ácidos o bases que se ha usado. Dichos autores observaron que el fosfato aceleraba más el pardeamiento de soluciones de glucosa, fructosa y xilosa, con y sin agregado de glicina, que el anión citrato.

El hecho de que el ácido fosfórico favorezca más que el ácido cítrico las reacciones de deterioro organoléptico (PNE) y nutricional (destrucción de AAs) estudiadas en el presente trabajo radicaría quizás, según fuera citado también por otros autores, en que el primero tiene menos poder complejante de iones metálicos que el citrato ácido. Esto quedaría confirmado si comparamos las constantes de formación, en agua pura y a 25°C, (modificadas a pH 3,5) de los complejos correspondientes con un ión metálico habitualmente presente y catalíticamente muy activo como el Fe (III):

COMPLEJO	Kf (*)	Kf" (**)
Fe <sup>3+</sup> /Cit H <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	10 <sup>6,3</sup>	5,22.10 <sup>4</sup>
Fe <sup>3+</sup> /Cit H <sup>3-</sup>	10 <sup>11,9</sup>	1,18.10 <sup>9</sup>
Fe <sup>3+</sup> /Cit <sup>4-</sup>	10 <sup>25,0</sup>	2,26.10 <sup>20</sup>
Fe <sup>3+</sup> /PO <sub>4</sub> H <sup>2-</sup>	10 <sup>9,4</sup>	8,97.10 <sup>7</sup>

(\*) Burriel Martí y col., 1985.

(\*\*) Constante de formación modificada por el pH (3,5) y por la acidez del ión Fe<sup>3+</sup> (Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> = Fe<sup>III</sup>).

siendo:  $K_{r_n}'' = K_r \cdot \alpha_n \cdot \alpha_{Fe}$       $n = 1, 2, 3$

$$\alpha_1 = [AH^{2-}] / C'_A$$

$$\alpha_2 = [AH_2^-] / C'_A$$

$$\alpha_3 = [A^{3-}] / C'_A$$

$$\alpha_{Fe} = [Fe^{III}] / C'_{Fe}$$

y:  $C'_A = [A^{3-}] + [AH^{2-}] + [AH_2^-] + [AH_3]$

$$C'_{Fe} = [Fe^{III}] + [Fe(OH)^{2+}] + [Fe(OH)_2^+] + [Fe(OH)_3]$$

Según muestran estos resultados, se ve que el Fe (III) se encuentra formando un complejo mucho más estable con el anión citrato neutro (Cit.<sup>4</sup>) que con el anión fosfato (PO<sub>4</sub>H<sup>2-</sup>) en agua pura.

Aunque se usaron reactivos de calidad analítica, ellos contienen trazas de iones metálicos (Fe, Cu), los que luego estarán presentes, inevitablemente, en el sistema preparado, aún utilizando agua desionizada.

De estas observaciones y de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que en sistemas de actividad de agua 0,94 y de composición química semejante, es preferible usar el ácido cítrico como acidificante si se desea minimizar el deterioro nutricional y organoléptico de alimentos conteniendo AAs.

#### 4.2.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)

En la Tabla 20 se observan las constantes de velocidad para la destrucción de la vitamina C en los sistemas A e I, acidificados a pH 3,5 con ácido cítrico y con ácido fosfórico, respectivamente. En el caso de las temperaturas de 70° y 80°C, como la destrucción del AAST no alcanza a llegar al 50% respecto de la concentración inicial, en el sistema A, el ajuste reportado para este sistema podría no ser el adecuado, siendo el que presentó una mayor potencia entre los de cero y uno testeados. A 70°C, los datos no

ajustaron ni a orden cero ni a uno por lo que se complementa la información con la Figura 45, a los fines comparativos.

Desde el punto de vista estadístico, se pudieron comprobar diferencias significativas entre las constantes de velocidad de destrucción del AAST a 80° y 90°C, para el sistema I (Tabla 20). En la Figura 45, se observa asimismo que la vitamina C decae mas lentamente a 70°C, que a 80° y que a 90°C. En cuanto al DHA, no existiría una influencia clara de la temperatura sobre el perfil cinético resultante en el sistema acidificado con acido fosfórico.

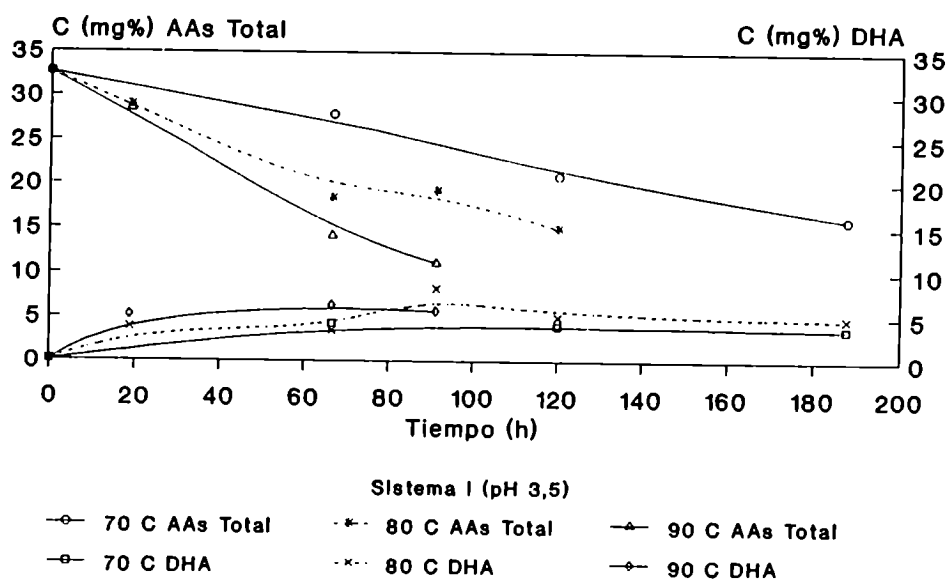


Fig. 45- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA en el sistema, en función del tiempo

**Tabla 20. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb).10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	NR	mg%/h	29,5 ± 18,6	--
	80	0	mg%/h	119,1 ± 12,2	
	90	0	mg%/h	197,7 ± 28,7	
I (Fosfórico)	70	0	mg%/h	94,8 ± 7,9	--
	80	1	1/h	6,7 ± 0,3	
	90	1	1/h	12,3 ± 0,5	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes

NR: no regresiona.

Al comparar los sistemas A e I a cada una de las temperaturas estudiadas, se lo debió hacer mediante gráficos (Figs. 46, 47 y 48) debido a la diferencia de órdenes obtenidos. La complejidad de la reacción dificulta dicha comparación, sin embargo, podemos decir que se notaría un leve aumento de la velocidad de degradación del AAST en el sistema acidificado con ácido fosfórico, especialmente a 70° y 80°C. Ello se debería a la menor capacidad complejante de este ácido respecto de la del ácido cítrico, como ya fuera explicado al hablar de AAs.

El DHA no muestra una influencia definida del acidificante usado. Cabe destacar que en el sistema I, a 80°C, se alcanza una concentración de DHA resultante mayor que la concentración de AAs remanente al final del estudio cinético. En los sistemas A e I, a 90°C, existen concentraciones comparables de AAs y de DHA al final del lapso estudiado.

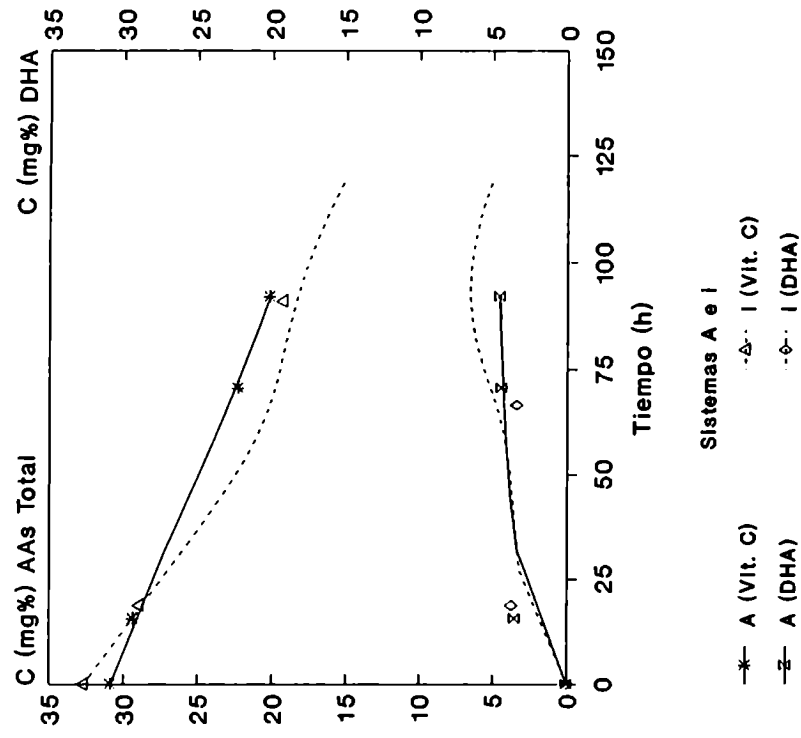


Fig. 47- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de aparición de DHA, a 80 C, en función del tiempo

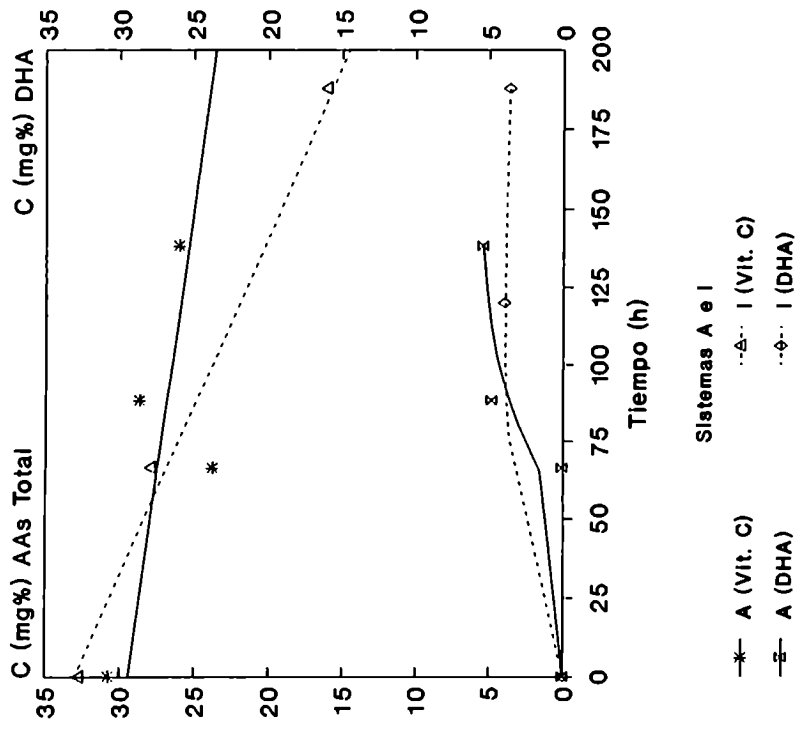


Fig. 46- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de aparición de DHA, a 70 C, en función del tiempo

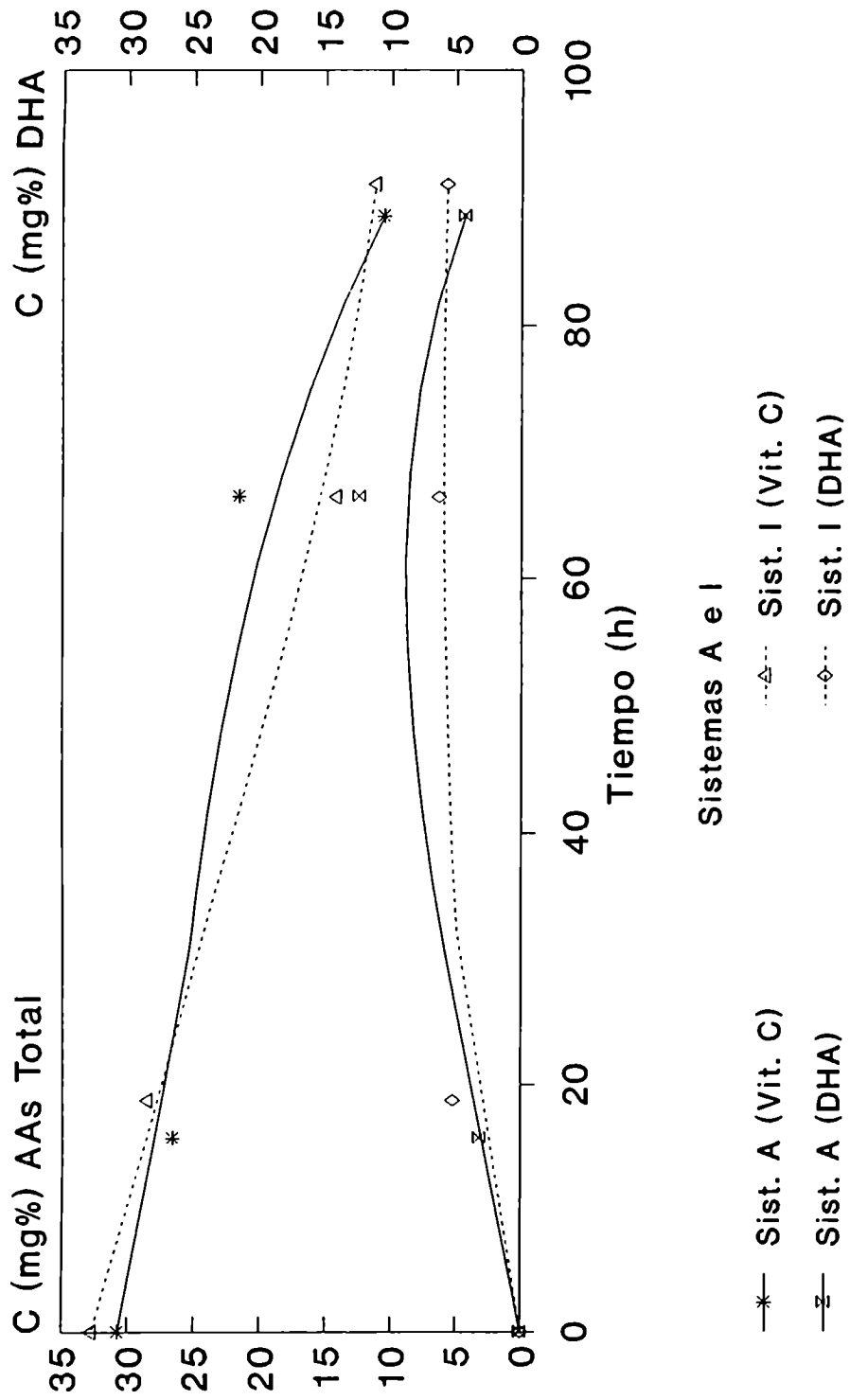


Fig. 48- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de aparición del DHA, a 90°C, en función del tiempo

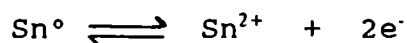
### 4.3. EFECTO DE LA PRESENCIA DEL ESTAÑO (II)

#### 4.3.1. Acido ascórbico

Cuando un alimento es puesto en contacto con la cara interna de un envase de hojalata, se genera una verdadera celda electroquímica o pila. En su interior, los envases de hojalata poseen un recubrimiento de estaño metálico de muy pequeño espesor que aísla al material que constituye el cuerpo del envase (aleación de hierro), protegiéndolo así del ataque de los constituyentes del alimento.

En la pila, el estaño actúa como ánodo (cediendo electrones) y al hierro se accede a través de imperfecciones de la cubierta de estaño metálico.

Los iones hidrógeno ( $H^+$ ) contenidos en un alimento ácido aceptan los electrones y se reducen a hidrógeno gaseoso, el que se acumula, en mayor o menor grado, en el interior de la lata cerrada. Como el área de la cubierta intacta de estaño metálico es muy superior a la mínima área total que puede ofrecer imperfecciones (a través de las cuales queda expuesto el hierro), éste resulta protegido por el estaño.

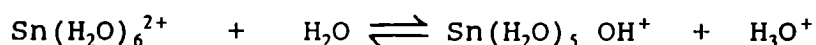


Otras sustancias, además de los iones hidrógeno, pueden actuar como aceptores de electrones: oxígeno gaseoso, iones nitrato, compuestos organosulfurados y oxaniones de S (IV) (Wedzicha, 1984).

Según esto, el catión estaño (II) estará contenido (en mayor o menor concentración) en alimentos enlatados ácidos como los jugos frutales y similares.

El catión Sn (II) es un importante reductor químico y además tiene reacción al medio muy ácida, existiendo en solución en estado hidratado:





La concentración de Sn (II) usada en la composición del sistema modelo G, fue elegida según la concentración media a la que habitualmente se lo encuentra en los alimentos ácidos envasados en latas no barnizadas, luego de un período de almacenamiento de 6 meses a un año (comunicación personal, CIEPS, INTI).

En la Tabla 21 se resumen los resultados obtenidos para la destrucción del AAs entre 70° y 90°C en condiciones de anaerobiosis. A 80° y 90°C, el Sn (II) presente provocó un aumento significativo de la velocidad de destrucción del AAs respecto de la del sistema A. Además produjo un incremento significativo de la velocidad de PNE a 70° y a 80°C, pero no a 90°C (Tabla 22).

**Tabla 21. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb).10 <sup>3</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,5 ± 0,4	25 ± 3
	80	6,6 ± 0,1 A	
	90	18,6 ± 0,7 B	
G Sn (II)	70	3,0 ± 0,1	27 ± 2
	80	9,8 ± 0,3 A	
	90	27,8 ± 2,4 B	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

**Tabla 22. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb) . 10 <sup>4</sup> (UAb/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,3 ± 0,2 A	34 ± 2
	80	10,2 ± 0,5 B	
	90	38,7 ± 0,4	
G Sn (II)	70	4,0 ± 0,4 A	30 ± 6
	80	26,1 ± 2,0 B	
	90	47,0 ± 6,6	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

En la Tabla 15 se puede observar, comparando las velocidades específicas que presentan los sistemas A y G, que la presencia de Sn (II) en una concentración de 10 ppm ( $9,7 \cdot 10^{-5}$  M, aproximadamente), en un medio acuoso con glucosa y a pH 3,5 (sistema G), produce un aumento significativo (aproximadamente un 25%) en la velocidad de PNE, en ausencia de AAs. Evidentemente, ello se debería a su efecto sobre la caramelización de la glucosa. Comparando los mismos sistemas modelo, pero ahora con AAs presente en el medio vemos que el Sn (II) provoca un aumento algo mayor del 155% en la velocidad de pardeamiento, a 80°C. Se observa así que hay mucha mayor influencia sobre el pardeamiento debido a la interacción glucosa-AAs que sobre aquél debido a la caramelización de la glucosa únicamente. Analizando la Tabla 15 en sentido horizontal vemos que la presencia de AAs en el sistema A hace aumentar la velocidad de PNE 2,3 veces y en el G, 4,7 veces. Evidentemente, la presencia de Sn (II) magnifica el efecto del agregado de AAs al sistema con glucosa.

En consecuencia, el efecto del ión Sn (II) sería el producir la aceleración del PNE de la mezcla glucosa-AAs (Tablas 15 y 22). A través de estas reacciones, exaltaría la destrucción del AAs a las altas temperaturas por un efecto de masa: al consumir productos de su degradación en el ciclo del PNE propio y/o de la glucosa (reacción de Michael) se promovería la destrucción del AAs.

#### **4.3.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)**

En la Tabla 23 se observan las constantes de velocidad de destrucción de la vitamina C obtenidas para el sistema modelo G, que contiene el ión Sn (II). Se puede notar que los resultados obtenidos a 70° y a 80°C ajustaron estadísticamente a orden uno y aquéllos obtenidos a 90°C lo hicieron a orden cero, si bien se debe destacar que a 70°C la destrucción de la vitamina alcanzada fue menor del 50% en el tiempo estudiado, lo cual aumenta la incertidumbre en la evaluación del orden correspondiente. Existen diferencias significativas (P: 0,95) entre las constantes de velocidad obtenidas a 70° y a 80°C (Tabla 23) en presencia de estaño. En la Figura 49, se observa que la degradación del AAsT en el sistema G a 70°C es menor que la obtenida a 80° y a 90°C, a cada instante. También se observa un leve aumento del DHA para cada tiempo con el aumento de temperatura, a 90°C.

La presencia de Sn (II) en el medio con glucosa como humectante, produce un aumento significativo (P: 0,95) de la velocidad de destrucción del AAsT, a 90°C, respecto de aquélla en el sistema A (Tabla 23). En la Figura 50 se observa igual efecto para una temperatura de 80°C, antes de las 70 horas de tratamiento. Sin embargo, a 70°C, la presencia del Sn (II) no produce un efecto claro sobre la velocidad de destrucción del AAsT en el sistema conteniendo glucosa a pH 3,5 (Fig. 51). Análogos resultados se encontraron para AAs.

**Tabla 23. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb).10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	NR	mg%/h	29,5 ± 18,6	
	80	0	mg%/h	119,1 ± 12,2	
	90	0	mg%/h	197,7 ± 28,7 A	
G Sn (II)	70	1	1/h	2,0 ± 0,1	
	80	1	1/h	5,8 ± 0,4	
	90	0	mg%/h	294,1 ± 10,3 A	

k: velocidad específica

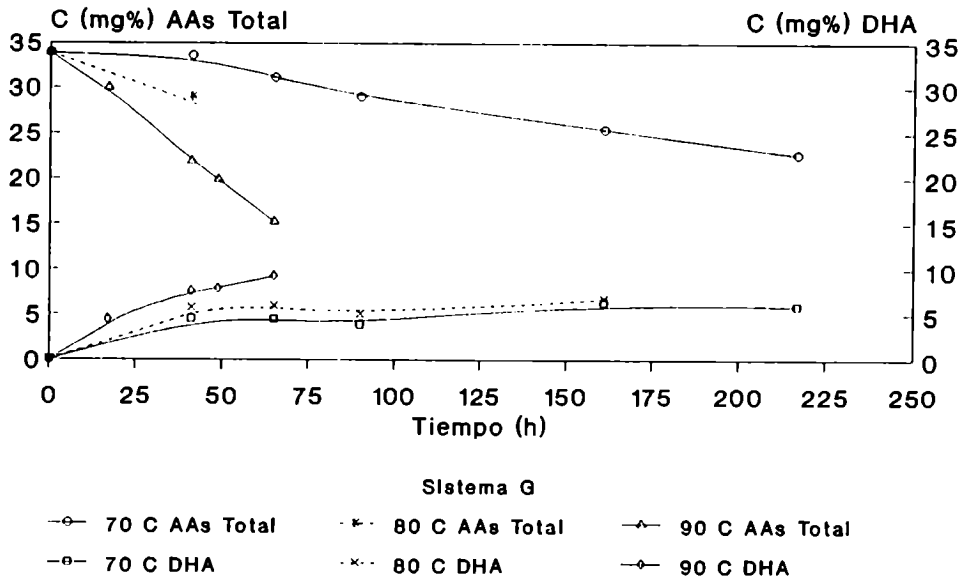
Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes

NR: no regresiona.



**Fig. 49- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA en el sistema, en función del tiempo**

A 70°C se observó también una más rápida formación inicial de DHA en el sistema G respecto de la del sistema A, diferencia que luego desaparece a las 80 horas de tratamiento (Fig. 51). No se detectan diferencias en la evolución del DHA a 80° y a 90°C en los sistemas con y sin estaño (Figs. 50 y 52). Al final del lapso estudiado se observa también que se alcanzan concentraciones equivalentes de DHA y de AAs remanente, a 80° y 90°C.

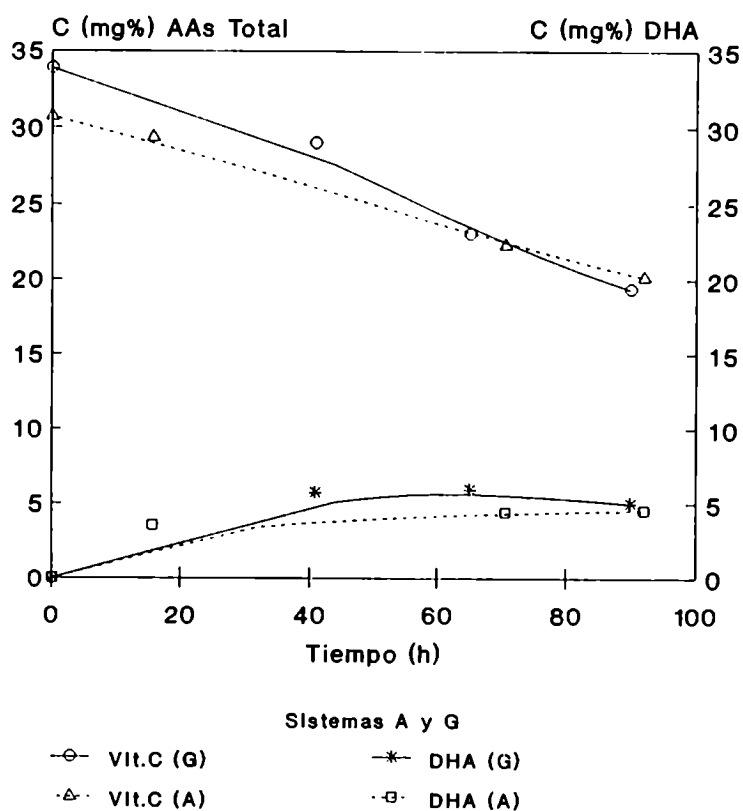
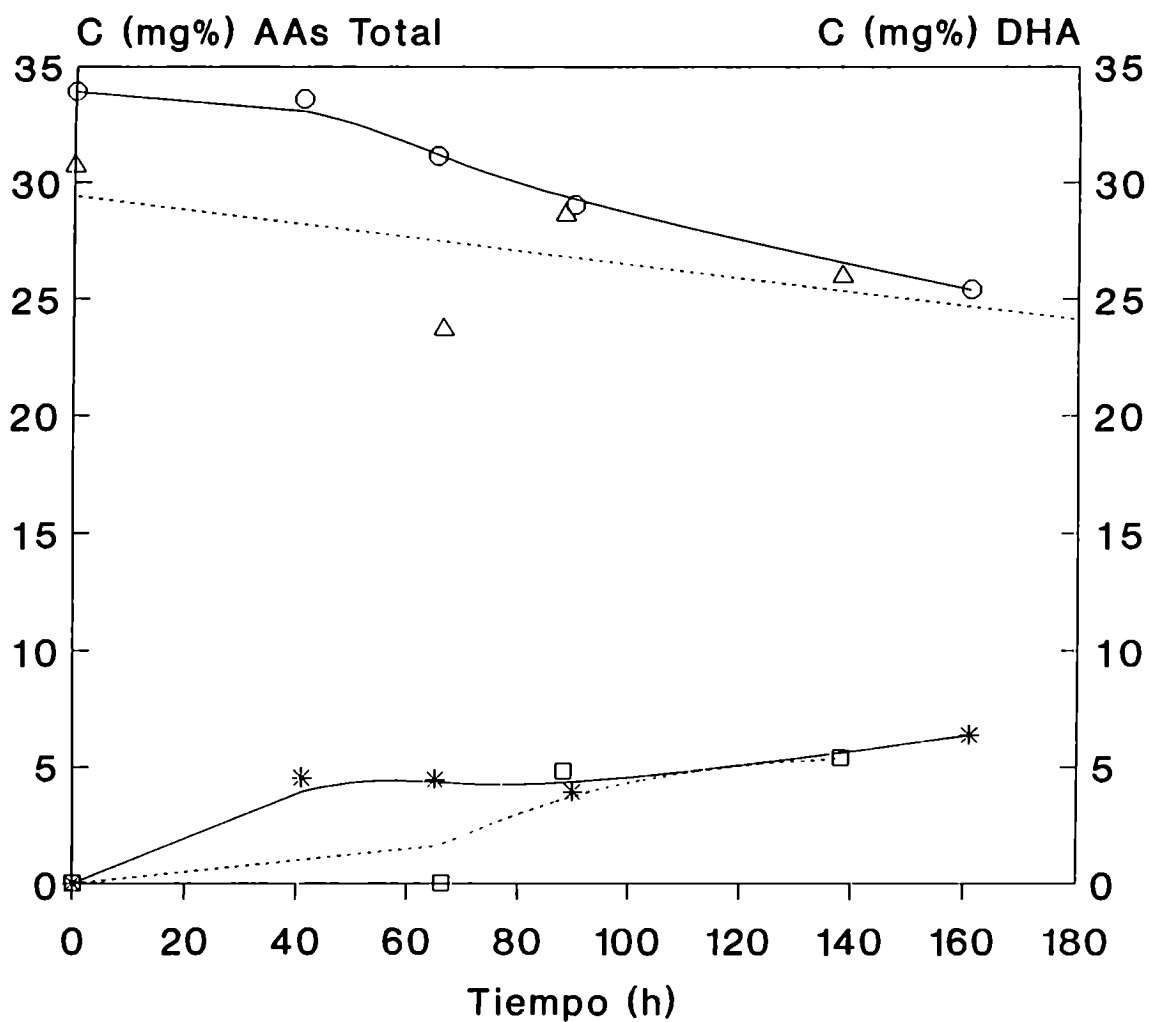


Fig. 50- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 80°C, en función del tiempo



Sistema A y G

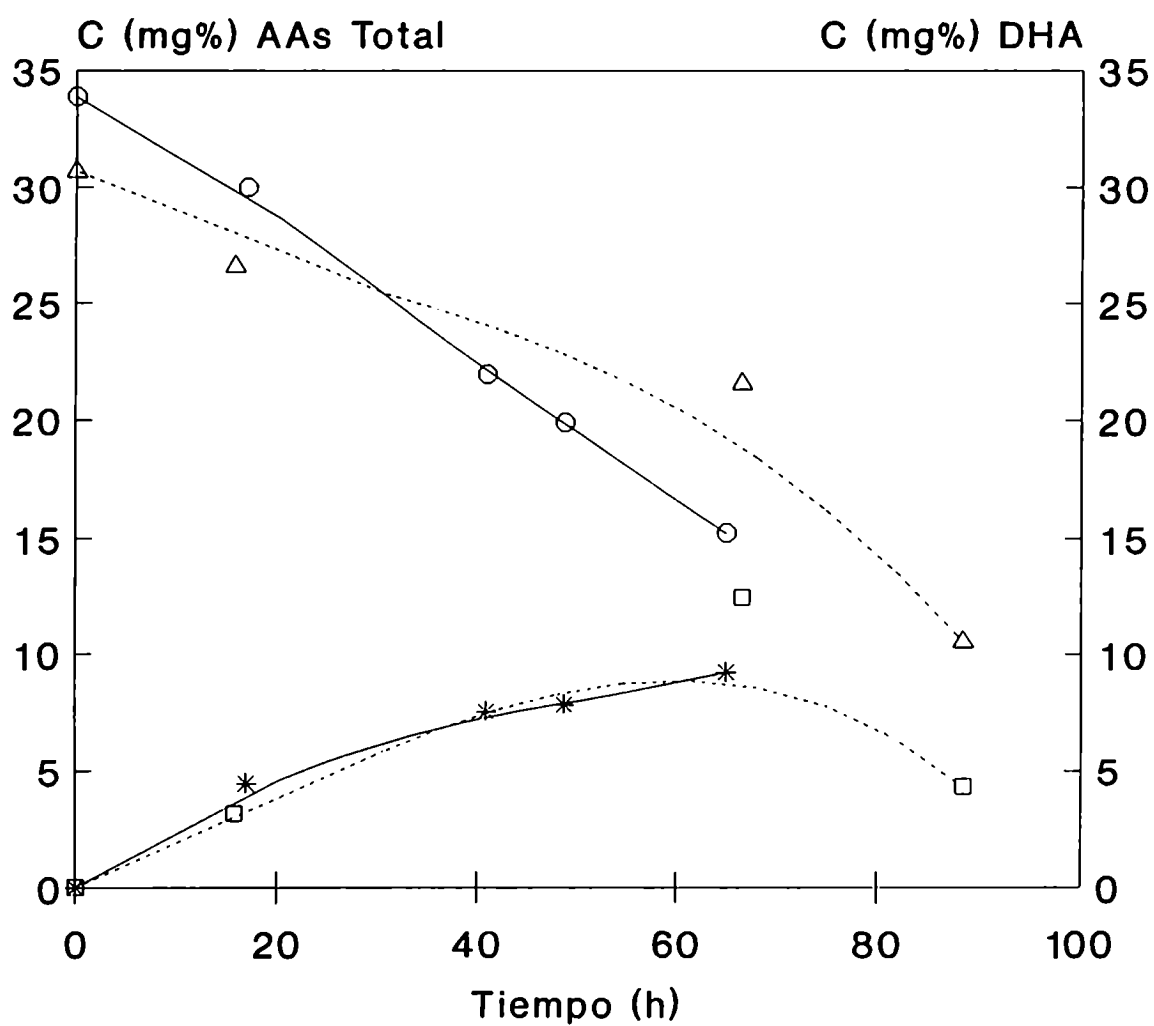
—○— Vit.C (G)

—\*— DHA (G)

··△·· Vit.C (A)

··□·· DHA (A)

Fig. 51- Perfiles de destrucción del AA's total (vitamina C) y de formación del DHA, a 70°C, en función del tiempo



Sistemas A y G

—○— Vit.C (G)

—\*— DHA (G)

--△-- Vit.C (A)

--□-- DHA (A)

Fig. 52- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 90°C, en función del tiempo

#### 4.4. EFECTO DEL HUMECTANTE UTILIZADO

##### 4.4.1. Acido ascórbico

En la Tabla 24 se observan las velocidades de destrucción del AAs obtenidas en el presente trabajo, para los sistemas modelo constituídos por distintos humectantes (glucosa, sacarosa, sorbitol) y sin aquéllos o sistema control (K), a las distintas temperaturas estudiadas.

En los sistemas A y E existió diferencia significativa entre las constantes de destrucción del AAs a las distintas temperaturas, observándose que aquélla aumentaba entre 24° y 90°C.

En el sistema D o con sorbitol hay también diferencia significativa entre todas las velocidades de degradación del AAs a las distintas temperaturas, pero la velocidad de destrucción del AAs a 45°C es mayor que a 70°C.

En el sistema K o control aumenta significativamente la velocidad de destrucción dentro de cada rango (24° a 45° y 70° a 90°C) al aumentar la temperatura pero, como en el sistema anterior, se da también una peculiaridad en cuanto a la relación de las constantes de velocidad entre dichos rangos de temperatura: la velocidad a 24°C no es significativamente diferente de la de 70°C y la velocidad a 45°C no es significativamente diferente de la de 80°C ni de la de 90°C.

Comparando entre sí los distintos sistemas modelo estudiados se observó una respuesta distinta del AAs a la presencia de los humectantes, en el rango de bajas temperaturas o de temperaturas de almacenamiento (24° a 45°C) y en el rango de altas temperaturas o de temperaturas de procesamiento térmico (70° a 90°C).



Tabla 24. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción.

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb) 10 <sup>3</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)	
A (Gluc/3,5)	24	0,17 ± 0,01	10 ± 3 A	
	33	0,26 ± 0,03		
	45	0,52 ± 0,06		
	70	70	2,46 ± 0,36	25 ± 3 A
		80	6,63 ± 0,11	
		90	18,55 ± 0,74	
D (Sorbitol)	24	0,48 ± 0,08	16 ± 4	
	33	0,74 ± 0,02		
	45	2,61 ± 0,20		
	70	70	1,34 ± 0,06	27 ± 4
		80	3,65 ± 0,37	
		90	13,40 ± 1,61	
E (Sacarosa)	24	0,30 ± 0,02	11 ± 2 B	
	33	0,59 ± 0,04		
	45	1,03 ± 0,02		
	70	70	7,85 ± 0,94	26 ± 6 B
		80	30,94 ± 1,80	
		90	60,71 ± 3,75	
K (Control)	24	1,36 ± 0,14	15 ± 3	
	33	2,41 ± 0,16		
	45	6,94 ± 0,74		
	70	70	1,50 ± 0,17	23 ± 3
		80	5,00 ± 0,08	
		90	9,75 ± 0,35	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95)

Sistema A: 24°<33°<45°<70°<80°<90° Temp. 24°C: K>D>E>A (k)

Sistema E: 24°<33°<45°<70°<80°<90° Temp. 33°C: K>D>E>A (k)

Sistema D: 24°<33°<70°<45°<80°<90° Temp. 45°C: K>D>E>A (k)

Sistema K: 24°=70°<33°<45°=80° Temp. 70°C: E>>A>D=K (k)

45°=90° Temp. 80°C: E>>A>D=K (k)

70°<80°<90° Temp. 90°C: E>>A>D=K (k)

24°<33°<45°

Entre 24° y 45°C, el AAs se destruye significativamente más rápido en el sistema control (K), seguido por aquél en el sistema con sorbitol (D), que en los sistemas con sacarosa (E) y con glucosa (A). Así, a las temperaturas de almacenamiento, la glucosa y, en menor grado, la sacarosa, actúan como protectores del AAs. En el rango de bajas temperaturas, la depresión de la actividad de agua a 0,94 por agregado de distintos humectantes determina una disminución de la destrucción del AAs. Labuza (1983) reportó el mismo resultado respecto de la disminución de la actividad de agua. Entre 70° y 90 °C, la relación anterior entre sistemas se altera. El AAs se vuelve más inestable en el sistema con glucosa a 70°, 80° y 90°C y algo más en el sistema con sacarosa (E) que en su ausencia. No existe diferencia significativa entre las velocidades de destrucción del AAs en los sistemas control (K) y con sorbitol (D) a 70°, 80° y 90°C. Es así que el efecto de la depresión de la  $a_w$  es diverso según el rango considerado de temperatura y parecería estar ligado a la naturaleza del humectante utilizado. A las altas temperaturas, los hidratos de carbono promoverían la destrucción.

Si se compara la energía de activación obtenida para el rango de 24° a 45°C con aquélla del de 70° a 90°C para el sistema modelo control (K) o para el sistema modelo con sorbitol (D) (Tabla 24), se observa un aumento de la energía de activación al aumentar el rango de temperatura. Sin embargo, esta diferencia no resulta significativa, probablemente por la magnitud de los errores implicados debido al bajo número de temperaturas factibles de ser analizadas en cada uno de los dos rangos. Para cada uno de los otros sistemas estudiados (A y E), las energías de activación aumentan significativamente al comparar la del rango de 24°-45°C con la del de 70°-90°C (Tabla 24). Lo antedicho se puede ver en la Figura 53. Allí se puede observar que para todos los sistemas estudiados existiría también una diferencia entre el factor preexponencial (Apéndice 2) del rango de bajas y del de altas temperaturas.

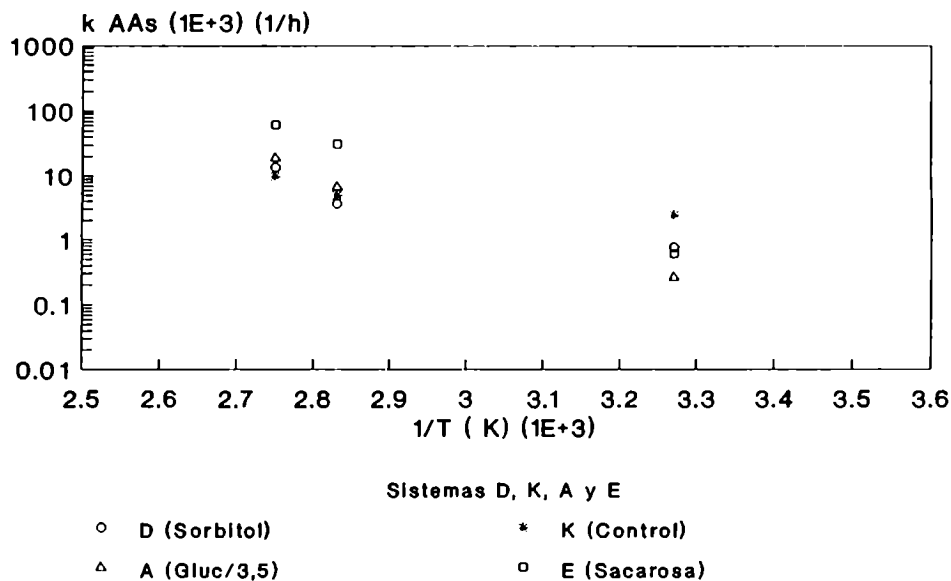


Fig. 53- Variación de la velocidad de destrucción del AAs con la inversa de la temperatura (24° a 90°C)

En la Tabla 24 se observa que en el rango de 70° a 90°C, las energías de activación de destrucción del AAs no son significativamente diferentes para el sistema control y los sistemas con los distintos humectantes. Lo mismo ocurre dentro del rango de 24° a 45°C. Nagy y Smooth (1977), estudiando la retención de vitamina C en jugo de naranja enlatado y almacenado durante doce semanas a temperaturas entre 4,4° y 48,9°C, encontraron que la relación entre las constantes de velocidad de destrucción y la temperatura obedecía a la ecuación de Arrhenius, pero dentro de dos regiones de temperatura que se diferenciaban por tener distinta energía de activación (Ea). De esta manera, un jugo de naranja almacenado y por encima de los 22°- 26,7°C, presenta una energía de activación mayor y, por lo tanto, un mayor efecto del incremento de la temperatura, que uno

almacenado por debajo de ese punto crítico o zona de quiebre. Lalikainen y col. (1958), estudiando el pardeamiento del AAs en soluciones tamponadas con citrato a pH 3,7 y 7,0, bajo nitrógeno y bajo oxígeno, a 37° y a 50°C y en presencia de glicina, encontraron que a 37°C la relación entre la producción de dióxido de carbono y la de pigmentos es lineal mientras que a 50°C no lo es. Esto mostraría, según los autores, un posible cambio en el mecanismo de reacción entre 37° y 50°C, el que también fuera postulado previamente por Joslyn (1956).

Como se observa en la Tabla 25, a 24°C no existen diferencias significativas entre las velocidades de PNE de los sistemas A, D, E y K, pero algunos de los sistemas (A, E, K) presentan períodos de inducción o lag. A mayores temperaturas ya se observa un mayor PNE en presencia de hidratos de carbono, tendencia que se magnifica a partir de 70°C. Como se observa en la precitada tabla, el efecto de la temperatura en las constantes de velocidad del PNE no siempre es significativo aunque la tendencia es al aumento de la velocidad al aumentar la temperatura, como era esperable. Es de destacar que en el rango 24°-45°C, la poca sensibilidad del PNE con la temperatura, impidió verificar el cumplimiento de una relación tipo Arrhenius. En el rango 70°-90°C, los sistemas con glucosa (A) y con sacarosa (E) presentan una energía de activación de alrededor de 34 kcal/mol, similar a la reportada por otros autores para esta reacción (Buera y col., 1987). Los sistemas control (K) y con sorbitol (D) no presentan una dependencia de tipo Arrhenius tampoco en este rango; en el primer caso la misma no se pudo verificar porque no hay diferencia significativa entre las constantes de velocidad de PNE a 80° y 90°C. Por todo lo antedicho se puede concluir que en el rango de temperatura de 70° a 90°C, el perfil de destrucción del AAs es semejante al perfil del PNE en presencia de los distintos humectantes y en el sistema control (K). Así, el PNE es significativamente más rápido en el medio con sacarosa (E), seguido por aquél en el medio con glucosa (A). Por el contrario, es considerablemente más lento

el oscurecimiento en presencia de sorbitol (D) y aquél en ausencia de humectantes (K), no existiendo diferencia significativa entre ambos, tal como puede verse en la Tabla 25.

**Tabla 25. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	Lag (días)	(k ± sb) 10 <sup>4</sup> (UAb/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	24	33	0,12 ± 0,01	34 ± 2
	33	55	0,33 ± 0,08	
	45	20	0,35 ± 0,05	
	70		2,34 ± 0,17	
	80		10,19 ± 0,46	
	90		38,70 ± 0,37	
D (Sorbitol)	24		0,20 ± 0,06	--
	33		0,21 ± 0,02	
	45		0,43 ± 0,05	
	70		0,56 ± 0,05	
	80		0,76 ± 0,17	
	90		4,03 ± 0,43	
E (Sacarosa)	24	53	0,18 ± 0,04	33 ± 8
	33	48	0,45 ± 0,07	
	45		0,89 ± 0,16	
	70		22,79 ± 3,85	
	80		196,26 ± 33,60	
	90		323,13 ± 37,48	
K (Control)	24	2	0,16 ± 0,02	--
	33		0,17 ± 0,03	
	45		0,67 ± 0,09	
	70		0,50 ± 0,06	
	80		1,22 ± 0,14	
	90		1,29 ± 0,19	

k: velocidad específica  
Ea: energía de activación  
sb: desviación estándar

\* Relaciones entre las constantes de velocidad (k):

Sistema A: 24° < 33° = 45° < 70° < 80° < 90° Temp. 24°C: K=D=E=A (k)  
Sistema E: 24° < 33° = 45° < 70° < 80° < 90° Temp. 33°C: K=D<A=E (k)  
Sistema D: 24° = 33° < 45° = 70° < 80° < 90° Temp. 45°C: K=D=A<E (k)  
Sistema K: 24° = 33° < 45° = 70° < 80° = 90° Temp. 70°C: K=D<A<E (k)  
Temp. 80°C: K=D<A<E (k)  
Temp. 90°C: K<D<A<E (k)

A las temperaturas de procesamiento térmico, probablemente el compromiso de los productos de destrucción del AAs en reacciones de pardeamiento del sistema y su interacción con los humectantes portadores de carbonilos activos en su molécula, serían responsables de la acelerada pérdida del nutriente. A altas temperaturas, cuando las reacciones de PNE están especialmente activadas, ellas determinarían la estabilidad del AAs en el medio. Así, en sorbitol (sistema D) o en el sistema sin humectantes (K), al no existir carbonilos activos para dichas reacciones, el AAs resultaría ser especialmente estable.

Si se analiza la Tabla 15, se puede observar que el sistema control (K) y el que contiene sorbitol (D) no presentan PNE significativo en ausencia de AAs y muy bajo en su presencia, a 80°C luego de 120 días. En cuanto a los sistemas conteniendo glucosa (A) y sacarosa (E), el cociente de sus velocidades específicas es 27,6 en ausencia de AAs y 19,2 en presencia del mismo. Evidentemente, a 80°C y pH 3,5, la sacarosa per se es casi 30 veces más activa en el PNE del medio que la glucosa. El que por su hidrólisis produzca glucosa y fructosa, determina dicha tendencia. La presencia de AAs en el medio, disminuyó aquella contribución. Esto se explica porque, comparando el efecto sobre ambos humectantes, el agregado de AAs contribuye en mayor grado al pardeamiento del medio con glucosa (sistema A). Esta mayor responsabilidad del AAs por el pardeamiento en el medio glucosado a pH 3,5, provoca la disminución considerable de la relación antes planteada. Así, el agregado de AAs sólo incrementa 1,6 veces la velocidad de PNE en el medio con sacarosa, pero lo hace 2,3 veces en el medio con glucosa (Tabla 15, relación  $k_{con AAs}/k_{sin AAs}$ ). Evidentemente, la considerable reactividad de los productos de hidrólisis de la sacarosa en el PNE, opaca la contribución relativa que pueda hacer el AAs al mismo, aún cuando el AAs se destruya mucho más rápidamente en medio de este humectante que en el medio con glucosa (Tabla 24). Se debe destacar que el agregado de AAs incrementa en mucho menor grado el PNE de los sistemas control (K) y con sorbitol

(D), que el de los sistemas con glucosa (A) y con sacarosa (E) (Tabla 15). Esto evidenciaría una interacción entre los productos de destrucción del AAs y los productos del PNE de los azúcares citados, como ya se explicó en el ítem 4.1.1 en el que se analizó el efecto del pH en la destrucción del AAs. Se explicaría así el aumento observado en la velocidad de destrucción del AAs en el rango 70°- 90°C (Tabla 24) como consecuencia del agregado de hidratos de carbono. Evidentemente, a las temperaturas de procesamiento térmico, las reacciones que llevan a la producción de intermediarios del pardeamiento favorecen la destrucción simultánea del AAs. A estas temperaturas, la depresión de la  $a_w$  mediante el uso de humectantes sin carbonilos activos en el PNE (sorbitol) sería preferible por producir una menor destrucción del AAs y ser el pardeamiento mucho menor (Tabla 25). Esto pone de manifiesto que el **AAs al destruirse**, sin la influencia de otras sustancias carbonilo-activas, **no produciría la acumulación de sustancias que absorban a 420 nm**, en el lapso estudiado. La ausencia de oxígeno libremente disponible contribuye a obtener estos resultados. Al igual que nosotros, Curl (1949) encontró que el agregado único de sorbitol como humectante permite que el AAs se destruya (en anaerobiosis) a igual velocidad que estando solo. Es sabido que en el rango de  $a_w$  0,9-1,0, el PNE disminuye al aumentar el  $a_w$ . Sin embargo, en nuestro ensayo se observa la gran influencia del humectante presente, pues para  $a_w$  0,94 el PNE del sistema con sorbitol es menor que para los sistemas con glucosa o sacarosa y semejante al del control ( $a_w \approx 1,00$ ).

En la Tabla 16 puede observarse el fuerte efecto (en el PNE) que tiene el humectante usado a las altas temperaturas. Así, por ejemplo, a 80°C y con 10 mg% de AAs remanente, la absorbancia alcanzada (medida a 420 nm) fue de 0,1650 luego de 159 horas cuando el sistema contenía glucosa, mientras que fue de 0,0301 luego de 290 horas en el sistema con sorbitol. Ello se debería a que los productos de destrucción del AAs no son fuente de absorbancia a dicha longitud de onda, a que el sorbitol no tiene carbonilos activos, a que la ausencia

de oxígeno no favorece la destrucción del ácido sórbico y a que el ácido cítrico tampoco produce absorbancia a esta longitud de onda, todo esto en el tiempo que duró la experiencia.

A las bajas temperaturas (24° a 45°C) la glucosa y la sacarosa disminuyen la destrucción de AAs respecto del control (K) o sistema sin humectantes. A su vez, la velocidad de destrucción de AAs en sorbitol (sistema D) es mayor que en presencia de los otros humectantes (Tabla 24). Por lo tanto, para asegurar una mayor retención de AAs a las temperaturas de almacenamiento, convendría usar como humectantes, los hidratos de carbono. Sin embargo, debe recordarse que ellos favorecen el PNE y, por lo tanto, es necesario hacer una cuidadosa evaluación sobre la conveniencia de su uso en cada caso. Joslyn y Supplee (1949) ya habían reportado la protección ejercida por los azúcares sobre la destrucción de AAs en anaerobiosis a 38,7°C. Parecería claro por todo lo visto previamente, que en el rango de temperaturas de 24° a 45°C, las reacciones de PNE no serían las responsables del perfil de destrucción demostrado por el AAs en los distintos medios.

En la Tabla 25, vemos que el uso de sacarosa en reemplazo de la glucosa como agente humectante para obtener una actividad de agua de 0,940, determina una velocidad de PNE muy superior, aún a pH 3,5. La presencia de AAs en el medio aumenta dicha velocidad (Tabla 15). La sacarosa debe primero hidrolizarse para poder participar en reacciones de PNE pues es un disacárido no reductor, lo que significa que no presenta un grupo carbonilo libre para reaccionar. El medio ácido favorece su hidrólisis y, por lo tanto, su participación en las reacciones de pardeamiento. A pH 3,5 se hidroliza fácilmente según una cinética de pseudoprimer orden con respecto a la concentración de sacarosa, para dar una molécula de glucosa y una de fructosa (Schoebel y col., 1969), generándose así dos grupos reductores por cada molécula original:



$$\ln (S_0/S) = k_H \cdot t$$

donde:  $S_0$  : concentración inicial de sacarosa.  
 $S$  : concentración de sacarosa a tiempo  $t$ .  
 $t$  : tiempo.

Las constantes de velocidad de hidrólisis ( $k_H$ ) de la sacarosa determinadas por Dawber y col. (1966), a 20°C, pH 3,5 y con una concentración inicial de sacarosa del 10%, sería menor a  $7 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ . Esto implicaría que, con una cinética de pseudoprimer orden, la concentración de sacarosa remanente después de 30 días de tratamiento de la solución a 20°C, sería:

$$\frac{S}{S_0} = e^{-k_H \cdot t}$$

$$\frac{S}{S_0} = \frac{0,0486}{1}$$

es decir, un 4,86% de la sacarosa permanecería sin hidrolizar. Esto significaría que, en realidad, a pH 3,5 el sistema con 52% de sacarosa (E) estaría constituido por una mezcla de glucosa, fructosa y sacarosa remanente. Observando la Tabla 25, se puede ver que en los sistemas modelo A y E a 24° y 33°C aparece un período de inducción antes de manifestarse el aumento de la absorbancia del sistema a 420 nm. Montes de Oca y col. (1991) observaron una hidrólisis del 25% en una solución constituida por 47% P/P de sacarosa y de pH 3,5 luego de 10 días de tratamiento a 37°C. Evidentemente, el lag observado no se debería al tiempo necesario para la hidrólisis del disacárido, sino que sería debido al retardo en la aparición de productos que absorban a 420 nm, tal como ocurre también en el caso de la glucosa (sistema A).

La glucosa resulta del equilibrio de dos formas anoméricas cíclicas:  $\alpha$  y  $\beta$  piranosa, de seis eslabones y que son más estables que las formas cíclicas de cinco eslabones, que son justamente las que presenta la fructosa. Este último

monosacárido tiene, además de las formas  $\alpha$  y  $\beta$  furanosa, las  $\alpha$  y  $\beta$  piranosas. El mayor porcentaje de forma acíclica que ya de por sí tiene la fructosa y el importante porcentaje de distribución de las formas furanósicas, hacen que sea mucho más reactiva que la glucosa a la caramelización (Van Dam y col., 1986; Buera y col., 1987). La contribución de la fructosa a la caramelización, hace que la velocidad de PNE del sistema con sacarosa a pH 3,5 (E), haya sido significativamente mayor que la del sistema con glucosa solamente (A).

Huelin y col. (1971) establecieron que la presencia de fructosa como tal o como resultado de la hidrólisis de la sacarosa, aumenta la velocidad de destrucción del AAs, tal como resultara también en el presente trabajo.

Curl (1949) estudió la retención de AAs en anaerobiosis y su relación con la aparición de PNE, con el objeto de obtener información acerca de los compuestos involucrados. Trabajó en sistemas modelo constituidos por soluciones acuosas de diferente composición: AAs, azúcares, aminoácidos, ácido cítrico y buffer citrato (pH 3,64 a 3,8), usando benzoato de sodio como conservador y envasándolos en latas con y sin barniz, almacenadas a 49°C y examinadas periódicamente. Observó que el AAs se destruye aún en ausencia de azúcares y aminoácidos y que la velocidad aumenta con la concentración de AAs. La presencia de azúcares (mezcla de glucosa, sacarosa y fructosa) acelera la destrucción de aquél. Estudiando los azúcares separadamente, encontró que la fructosa es el que más acelera la destrucción y aún más profundiza la intensidad del pardeamiento. En el presente trabajo, se observó también la mayor velocidad de destrucción del AAs, en el rango de 70° a 90°C, en el sistema con sacarosa.

El comportamiento diferencial del AAs en presencia de los distintos humectantes requiere una explicación, especialmente considerando las distintas tendencias observadas en ambos rangos de temperatura estudiados.

En el presente trabajo se han observado energías de

activación diferentes en los dos rangos de temperatura estudiados (24° a 45°C y 70° a 90°C) para un dado sistema modelo. Además, para un rango dado de temperatura, se ha observado que las energías de activación han sido semejantes y las constantes de velocidad de reacción (k) diferentes, según el humectante o la composición del medio. Algunas veces, las diferencias entre las energías de activación han sido usadas como evidencia de un cambio en el mecanismo de reacción. Esta práctica ha sido inconducente. Por ejemplo, no es raro que reacciones que representan los extremos de una línea isocinética (Apéndice 2) y que, por lo tanto, probablemente tengan igual mecanismo de reacción, presenten energías de activación que difieran entre sí. Una reacción de diferente mecanismo probablemente estará desplazada de la línea isocinética y también probablemente diferirá considerablemente en su constante de velocidad, pero podría fácilmente tener la misma energía de activación que otra reacción cuyos puntos están ubicados sobre la línea isocinética. Leffler (1955; 1966) analizó la aplicación de la compensación entálpico-entrópica (Apéndice 2) a la química orgánica, estableciendo que cuando una reacción ocurre en un medio que va cambiando moderadamente,  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$  varían, pero no independientemente. Un importante aspecto del fenómeno de compensación es que **él explica el que un cambio de energía de activación no necesariamente involucra un cambio de mecanismo**. Comparando los resultados aquí obtenidos, surge la duda sobre la ocurrencia de un mismo mecanismo de reacción en todos los casos. Sin embargo, en todos ellos se está analizando la destrucción del AAs por la **vía anaeróbica**. En nuestro trabajo, si se probara un alineamiento significativo en una línea isocinetica común, se justificaría la existencia de un mecanismo único de destrucción, aunque la composición química del medio fuera diferente. Las tendencias observadas serían así un resultado del arreglo del solvente en torno a reactivos y productos para minimizar los cambios de energía libre. Es interesante entonces considerar la posibilidad de que sea el **efecto del solvente**, explicado a nivel

microscópico (molecular) el que determine tal forma de variabilidad de la velocidad de destrucción del AAs en los diferentes medios con los distintos humectantes.

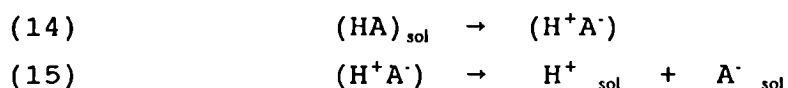
Para ver la posibilidad de existencia de un posible **efecto del solvente** sobre una dada reacción química, muchos autores sugieren verificar la forma en que varía  $\Delta H^\ddagger$  en función de  $\Delta S^\ddagger$ , para la formación del complejo activado en cuestión (Leffler, 1955, 1966; Labuza, 1980). En otras palabras, verificar la posible existencia de una compensación entálpico-entrópica.

#### 4.4.1.1. Compensación entálpico-entrópica

Hay una cantidad de procesos de equilibrio o cinéticos en los que graficando cambios entálpicos contra cambios entrópicos producidos por una variación sistemática de la composición del solvente, o por cambios en las moléculas reaccionantes o de pH del medio, se obtiene una línea recta (Leffler, 1966). La pendiente de esta recta es llamada **temperatura isocinética** ( $\beta$ ) y la relación es llamada compensación entálpico-entrópica. Este tipo de compensaciones pueden ser encontradas en química orgánica así como también en reacciones bioquímicas que ocurren en medio acuoso (Labuza, 1980).

Leffler y Grunwald (1963) trataron el fenómeno de compensación entálpico-entrópica en reacciones de química orgánica en distintos solventes y con distintos sustituyentes en la molécula reaccionante, puntualizando que un cambio en la energía de activación no necesariamente significa un cambio de mecanismo.

Se propone así que se puede separar cualquier reacción que ocurre en solución, en su parte química propiamente dicha (14) y en su parte de solvatación (15):



Lo que esto significa es que el solvente se acomoda por sí mismo alrededor de los reactivos y productos de una reacción con el objeto de minimizar los cambios de energía libre. Según Labuza (1980), esto ocurre en muchas reacciones en medio acuoso.

Leffler (1966) introdujo la idea que quizás el ajuste a una línea recta de los datos de  $\Delta H^\ddagger/\Delta S^\ddagger$  fuese fortuito y debido a efectos de propagación de errores ya que  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$  son obtenidos ambos a partir de los datos cinéticos hallados experimentalmente ( $k$ ,  $E_a$ ). Cuando los errores experimentales predominan sobre la verdadera distribución de entalpías y entropías, aparece también un buen ajuste a la linealidad, pero donde la pendiente ( $\beta$ ) resultante es igual o muy cercana a la temperatura media aritmética de las temperaturas experimentales a partir de los cuales fueron realizados los estudios cinéticos. En la mayoría de los casos, el coeficiente de correlación  $r^2$  es muy cercano a 1.

Krug y col. (1976, a y b), destacaron que cuando los datos son graficados del modo usual, la distribución observada de los puntos experimentales a lo largo de una recta en el plano  $\Delta H^\ddagger - \Delta S^\ddagger$ , es más a menudo debida a la propagación de errores experimentales que a variaciones químicas. Ellos desarrollaron un test de hipótesis para determinar si el efecto de compensación entálpico-entrópica observado tiene una verdadera contribución química o si la distribución de datos observada en el plano  $\Delta H^\ddagger - \Delta S^\ddagger$  es indistinguible de un patrón estadístico generado por errores azarosos. Su test es de aplicación cuando las entalpías, entropías y energías libres son estimadas a partir de las velocidades de reacción ( $k$ ) o de las constantes de equilibrio ( $K_{eq}$ ) a distintas temperaturas. Los autores asumieron que los errores asociados con la determinaciones ( $\ln k_i$  y  $\ln K_i$ ) están normalmente e independientemente distribuidos, con media cero y varianza constante y que, a su vez, las constantes varían con la temperatura según Arrhenius. Asimismo, destacaron la conveniencia de hacer el estudio en un rango amplio de temperatura.

Ellos determinaron que cuando el error experimental es alto, la pendiente del gráfico de compensación entálpico-entrópica,  $\beta$ , es:

$$\beta = T_{hm}$$

donde  $T_{hm}$  es la temperatura armónica media:

$$T_{hm} = \frac{n}{\sum (1/T)}$$

donde:  $n = n^{\circ}$  de temperaturas experimentales

$T =$  temperatura absoluta experimental

La hipótesis nula planteada en su test fue:

$$H_0) \beta = T_{hm}$$

donde  $\beta$  es la pendiente de la recta obtenida al graficar  $\Delta H^{\ddagger}$  versus  $\Delta S^{\ddagger}$ .

A menos que esta hipótesis pueda ser rechazada, no hay razón para sospechar la existencia de una causa química de la compensación y, por lo tanto, no hay razón para buscar teorías para explicarla.

Para probar la hipótesis nula, la pendiente  $\beta$  debe ser comparada con  $T_{hm}$ . Un intervalo de confianza (IC) para  $\beta$  puede ser calculado así:

$$IC\beta = \beta \pm [(t_{(m-2; \alpha/2)}) \cdot \sqrt{V(\beta)}]$$

donde:

$$\beta = \frac{\sum (\Delta H - \overline{\Delta H}) \cdot (\Delta S - \overline{\Delta S})}{\sum (\Delta S - \overline{\Delta S})^2}$$

$$V(\beta) = \frac{\sum (\Delta H - \overline{\Delta H} - \beta \cdot \Delta S)^2}{(m-2) \cdot \sum (\Delta S - \overline{\Delta S})^2}$$

$m =$  número de pares de datos ( $\Delta S^{\ddagger} - \Delta H^{\ddagger}$ ).

$t_{(m-2; \alpha/2)} =$  parámetro de la función de distribución "t" de Student para  $m-2$  grados de libertad y un nivel de probabilidad  $\alpha/2$  (test a dos colas).

Si la  $T_{lm}$  cae fuera de este intervalo de confianza, la hipótesis nula puede ser rechazada con un nivel  $\alpha$  de significación; entonces en este caso la compensación observada tendría una fuerte contribución química.

El coeficiente de correlación propuesto entre  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$ , para una correlación lineal, es:

$$\rho = \frac{\text{Cov}(\Delta H^\ddagger, \Delta S^\ddagger)}{\sqrt{V(\Delta H^\ddagger) V(\Delta S^\ddagger)}} = \frac{\Sigma 1/T}{\sqrt{n \cdot \Sigma (1/T)^2}}$$

Este coeficiente de correlación depende solamente de las temperaturas experimentales elegidas. Conforme el rango de temperaturas experimentales es más pequeño, el coeficiente de correlación se aproxima a la unidad.

Si las variaciones químicas en  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$  son pequeñas comparadas con la inseguridad en la estimación de estos parámetros, el coeficiente de correlación estimado  $r$  es un estimador del parámetro poblacional  $\rho$ :

$$r = \frac{\Sigma (\Delta H - \overline{\Delta H}) \cdot (\Delta S - \overline{\Delta S})}{\sqrt{\Sigma (\Delta H - \overline{\Delta H})^2 \cdot \Sigma (\Delta S - \overline{\Delta S})^2}}$$

$$\lim_{n \rightarrow \infty} r = \rho$$

Se ha demostrado que valores altos del coeficiente de correlación estimado  $r$  no permiten inferir que haya una verdadera causa química en la correlación  $\Delta H^\ddagger - \Delta S^\ddagger$  observada.

A partir de las constantes de destrucción del ácido L-(+)-ascórbico obtenidas en el presente trabajo, para los sistemas modelo envasados en anaerobiosis, se calcularon las energías de activación correspondientes. Conociendo éstas, se pudieron calcular las diferencias de entalpía y de entropía correspondientes a la formación del complejo activado (Apéndice 2) que se observan en la Tabla 26a para los sistemas A, D, E, K y J, y en la Tabla 26b para los sistemas A, B, C, D, E, G, H, I, J y K.

Al graficar los cambios entrálpicos ( $\Delta H^\ddagger$ ) en función de los cambios entrópicos ( $\Delta S^\ddagger$ ) correspondientes a la

destrucción anaeróbica del ácido L-ascórbico, para los sistemas de ambas tablas, se obtiene una recta (Figuras 54 y 55). En la recta se incluyen los  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$  correspondientes a las velocidades de destrucción del AAs, donde tal cosa ocurre según una cinética de orden uno.

A los resultados obtenidos en el presente trabajo y reflejados en las tablas 26a y 26b, se les aplicó el test de Krug y col. (1976a), para evaluar la significatividad de la relación observada, es decir, ver si existe un verdadero fenómeno de compensación entálpico-entrópica que determine esta relación, obteniéndose los resultados indicados en dichas tablas.

Ellos revelan que la relación observada es significativa y que, por lo tanto, existe una compensación entálpico-entrópica en la destrucción anaeróbica del ácido ascórbico.

En la Tabla 26b se observa que la diferencia de entropía para el complejo activado en la reacción de destrucción anaeróbica del ácido ascórbico resulta ser negativa para todos los sistemas, excepto para el de glucosa a pH 5,0 (C), donde es mayor a cero. La disminución (aunque pequeña) en la entropía de formación del estado de transición, se podría adjudicar a la participación de las moléculas de solvente en la formación del complejo activado. Los valores negativos para las entropías de activación indican un cierto grado de orden neto en los estados de transición. El intermediario podría estar estabilizado por coordinación con moléculas de solvente. Isbell y Pigman (1969), observaron un fenómeno análogo cuando estudiaron la mutarrotación de azúcares.

Lo que cambia de un sistema estudiado a otro es, entonces, el entorno químico de las moléculas de ácido L-ascórbico, constituido por el agua y el humectante presente en altas concentraciones relativas (sorbitol, glucosa o sacarosa). Es como si en realidad se estuviese estudiando la destrucción anaeróbica del ácido ascórbico en distintos solventes. La estructura del medio circundante a las moléculas de ácido L-ascórbico determinaría, así, la mayor o menor facilidad de transformación química del AAs por el



Tabla 26a. Resultados obtenidos aplicando el Test de Krug y col. (1976a).

SISTEMA MODELO	t (°C)	T (°K)	1/T	k (orden 1)	Ea*	$\Delta H^{**}$	$\Delta S^{***}$	$\Delta G^{**}$
D	24	297	3,37E-03	1,14E-02	16	15,406	-0,0337	25,410
	33	306	3,27E-03	1,77E-02		15,388	-0,0350	26,107
	45	318	3,14E-03	6,27E-02		15,364	-0,0351	26,525
K	24	297	3,37E-03	3,26E-02	15	14,406	-0,0350	24,788
	33	306	3,27E-03	5,78E-02		14,388	-0,0359	25,385
	45	318	3,14E-03	1,67E-01		14,364	-0,0363	25,904
A	24	297	3,37E-03	4,12E-03	10	9,406	-0,0559	26,018
	33	306	3,27E-03	6,17E-03		9,388	-0,0568	26,754
	45	318	3,14E-03	1,25E-02		9,364	-0,0572	27,552
J	24	297	3,37E-03	2,35E-03	16	15,406	-0,0369	26,352
	33	306	3,27E-03	3,52E-03		15,388	-0,0383	27,097
	45	318	3,14E-03	1,26E-02		15,364	-0,0383	27,544
E	24	297	3,37E-03	7,19E-03	11	10,406	-0,0515	25,687
	33	306	3,27E-03	1,41E-02		10,388	-0,0518	26,247
	45	318	3,14E-03	2,46E-02		10,364	-0,0527	27,119
K	70	343	2,92E-03	1,50E-03	23	22,314	-0,0203	29,293
	80	353	2,83E-03	5,00E-03		22,294	-0,0201	29,392
	90	363	2,75E-03	9,75E-03		22,274	-0,0208	29,826
A	70	343	2,92E-03	2,46E-03	25	24,314	-0,0135	28,955
	80	353	2,83E-03	6,63E-03		24,294	-0,0139	29,194
	90	363	2,75E-03	1,86E-02		24,274	-0,0140	29,359
D	70	343	2,92E-03	1,34E-03	27	26,314	-0,0089	29,373
	80	353	2,83E-03	3,65E-03		26,294	-0,0094	29,615
	90	363	2,75E-03	1,34E-02		26,274	-0,0091	29,595
E	70	343	2,92E-03	7,85E-03	26	25,314	-0,0083	28,159
	80	353	2,83E-03	3,09E-02		25,294	-0,0080	28,106
	90	363	2,75E-03	6,07E-02		25,274	-0,0089	28,498
J	70	343	2,92E-03	2,01E-03	28	27,314	-0,0052	29,094
	80	353	2,83E-03	7,01E-03		27,294	-0,0053	29,154
	90	363	2,75E-03	2,05E-02		27,274	-0,0055	29,287
m				30	$\bar{X}$	19,040	-0,027	27,713

(\*) Kcal/mol; (\*\*) Kcal/°K.mol

$$\beta = 362,2^{\circ}\text{K} \quad \text{Thm} = 328,2^{\circ}\text{K}$$

$$t(m-2) = 2,048 \quad r = 0,993$$

$$\beta - [t \cdot V(\beta)^{1/2}] = 330,3$$

$$V(\beta) = 241,9 \quad V(\beta)^{1/2} = 15,6$$

$$t(m-2)V(\beta)^{1/2} = 31,9 \quad \beta + [t \cdot V(\beta)^{1/2}] = 394,0$$

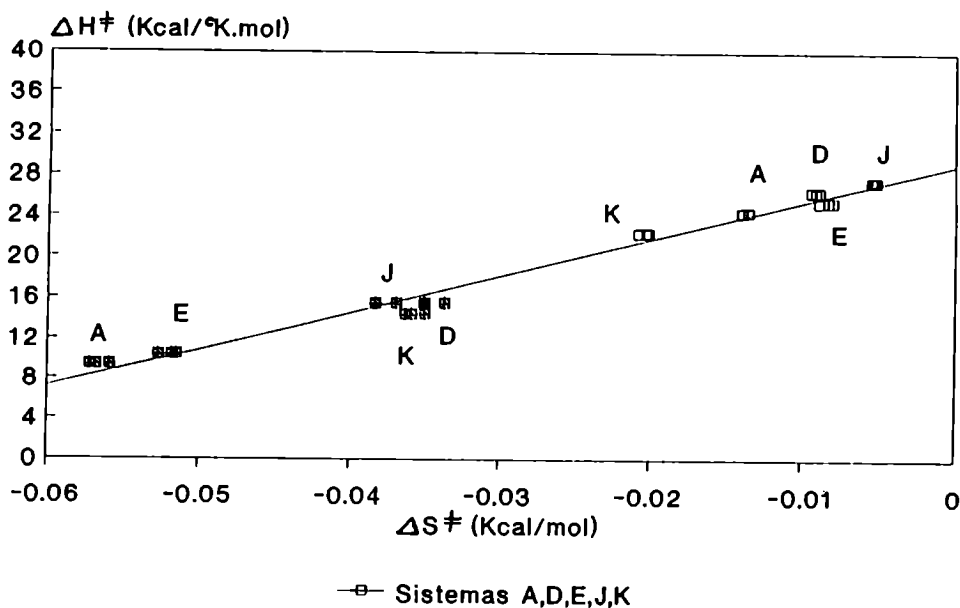


Fig. 54- Representación gráfica de los datos correspondientes a la Tabla 26a:  $\Delta H^\ddagger$  vs.  $\Delta S^\ddagger$

mecanismo anaerobio. De hecho, las configuraciones de las moléculas (AAs y carbohidratos) son determinadas por las interacciones soluto-solvente, a través de la formación de puentes de hidrógeno. Este es el principal modo de interacción de los carbohidratos con el agua (Suggett, 1975; Taylor y Rowlinson, 1955).

**Tabla 26b. Resultados obtenidos aplicando el Test de Krug y col. (1976a).**

SISTEMA MODELO	t (°C)	T (°K)	1/T	k (orden 1)	Ea*	$\Delta H^{**}$	$\Delta S^{***}$	$\Delta G^{**}$
D	24	297	3,37E-03	1,14E-02	16	15,406	-0,0337	25,410
	33	306	3,27E-03	1,77E-02		15,388	-0,0350	26,107
	45	318	3,14E-03	6,27E-02		15,364	-0,0351	26,525
K	24	297	3,37E-03	3,26E-02	15	14,406	-0,0350	24,788
	33	306	3,27E-03	5,78E-02		14,388	-0,0359	25,385
	45	318	3,14E-03	1,67E-01		14,364	-0,0363	25,904
A	24	297	3,37E-03	4,12E-03	10	9,406	-0,0559	26,018
	33	306	3,27E-03	6,17E-03		9,388	-0,0568	26,754
	45	318	3,14E-03	1,25E-02		9,364	-0,0572	27,552
J	24	297	3,37E-03	2,35E-03	16	15,406	-0,0369	26,352
	33	306	3,27E-03	3,52E-03		15,388	-0,0383	27,097
	45	318	3,14E-03	1,26E-02		15,364	-0,0383	27,544
E	24	297	3,37E-03	7,19E-03	11	10,406	-0,0515	25,687
	33	306	3,27E-03	1,41E-02		10,388	-0,0518	26,247
	45	318	3,14E-03	2,46E-02		10,364	-0,0527	27,119
K	70	343	2,92E-03	1,50E-03	23	22,314	-0,0203	29,293
	80	353	2,83E-03	5,00E-03		22,294	-0,0201	29,392
	90	363	2,75E-03	9,75E-03		22,274	-0,0208	29,826
A	70	343	2,92E-03	2,46E-03	25	24,314	-0,0135	28,955
	80	353	2,83E-03	6,63E-03		24,294	-0,0139	29,194
	90	363	2,75E-03	1,86E-02		24,274	-0,0140	29,359
D	70	343	2,92E-03	1,34E-03	27	26,314	-0,0089	29,373
	80	353	2,83E-03	3,65E-03		26,294	-0,0094	29,615
	90	363	2,75E-03	1,34E-02		26,274	-0,0091	29,595
E	70	343	2,92E-03	7,85E-03	26	25,314	-0,0083	28,159
	80	353	2,83E-03	3,09E-02		25,294	-0,0080	28,106
	90	363	2,75E-03	6,07E-02		25,274	-0,0089	28,498
J	70	343	2,92E-03	2,01E-03	28	27,314	-0,0052	29,094
	80	353	2,83E-03	7,01E-03		27,294	-0,0053	29,154
	90	363	2,75E-03	2,05E-02		27,274	-0,0055	29,287
B	70	343	2,92E-03	3,23E-03	27	26,314	-0,0072	28,768
	80	353	2,83E-03	1,14E-02		26,294	-0,0071	28,810
	90	363	2,75E-03	3,03E-02		26,274	-0,0075	29,002

(\*) Kcal/mol; (\*\*) Kcal/°K.mol

(CONT.)

(CONT. Tabla 26b)

SISTEMA MODELO	t (°C)	T (°K)	1/T	k (orden 1)	Ea*	$\Delta H^{\ddagger}$ **	$\Delta S^{\ddagger\dagger\dagger}$	$\Delta G^{\ddagger}$ **
C	70	343	2,92E-03	2,81E-03	35	34,314	0,0159	28,863
	80	353	2,83E-03	1,37E-02		34,294	0,0159	28,680
	90	363	2,75E-03	4,95E-02		34,274	0,0155	28,646
H	70	343	2,92E-03	3,04E-03	21	20,314	-0,0248	28,811
	80	353	2,83E-03	1,11E-02		20,294	-0,0242	28,828
	90	363	2,75E-03	1,76E-02		20,274	-0,0251	29,398
I	70	343	2,92E-03	5,04E-03	18	17,314	-0,0325	28,463
	80	353	2,83E-03	1,00E-02		17,294	-0,0329	28,902
	90	363	2,75E-03	2,18E-02		17,274	-0,0330	29,240
G	70	343	2,92E-03	3,01E-03	27	26,314	-0,0073	28,816
	80	353	2,83E-03	9,70E-03		26,294	-0,0074	28,918
	90	363	2,75E-03	2,78E-02		26,274	-0,0077	29,064
m				45	$\bar{X}$	20,098	-0,0211	26,906

(\*) Kcal/mol; (\*\*) Kcal/°K.mol

$$\beta = 359,2^{\circ}\text{K} \quad T_{hm} = 328,2^{\circ}\text{K}$$

$$t(m-2) = 2,021 \quad r = 0,995$$

$$\beta - [t \cdot V(\beta)^{1/2}] = 342,2$$

$$V(\beta) = 70,4$$

$$t(m-2)V(\beta)^{1/2} = 17,0$$

$$V(\beta)^{1/2} = 8,4$$

$$\beta + [t \cdot V(\beta)^{1/2}] = 376,1$$

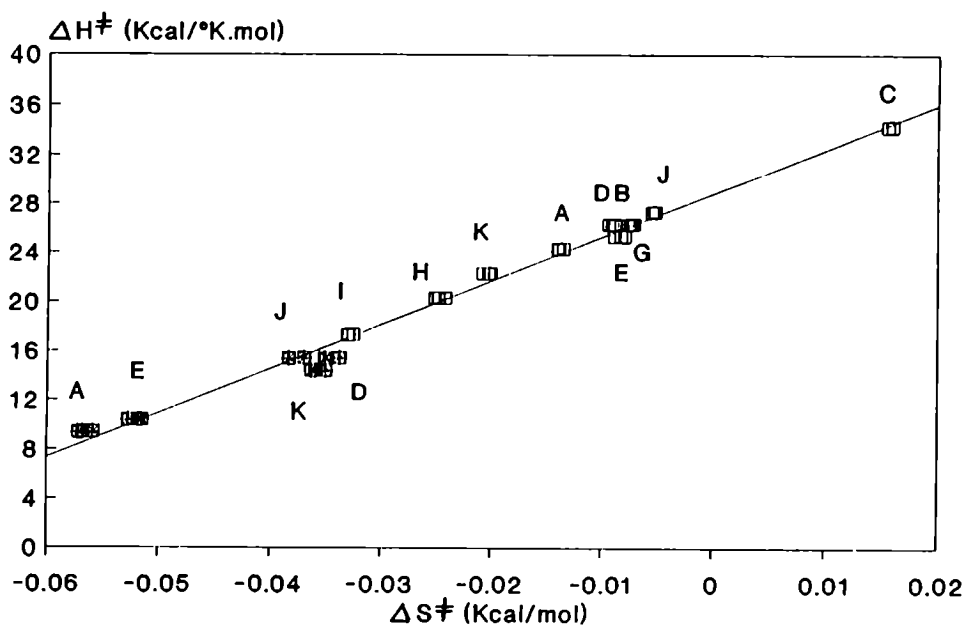


Fig. 55- Representación gráfica de los datos correspondientes a la Tabla 26b:  $\Delta H^{\ddagger}$  vs.  $\Delta S^{\ddagger}$

#### 4.4.1.2. Estructura del agua

La definición de estructura depende de la posibilidad de:

- 1) Poder definir ciertas unidades estructurales mediante distancias, ángulos de enlace, etc.
- 2) que exista un número finito de estas entidades y
- 3) que el tiempo de vida de las mismas sea al menos un orden de magnitud superior al período de vibración molecular.

Estas condiciones se cumplen en el caso de sólidos cristalinos, en cambio los vidrios no satisfacen la condición 2. Para el caso del agua se han observado, mediante rayos X y difracción de neutrones, regularidades que confirman la existencia de estructuras que poseen un tiempo de vida del orden de  $10^{-12}$  seg (determinado mediante relajación dieléctrica), mientras que el período de vibración molecular es del orden de  $10^{-13}$  seg. Podemos entonces hablar de "estructura del agua" y considerarla como un líquido estructurado, o asociado, como prefieren llamarlo otros autores (Grigera, 1976).

Los modelos estructurales del agua pueden clasificarse globalmente en **modelos continuos** o **modelos de mezclas**. Los modelos continuos son aquéllos en los que todas las moléculas se encuentran interconectadas (por puentes de hidrógeno) y son indistinguibles unas de otras. En los modelos de mezclas existen ciertas moléculas que forman parte de una de las especies y otras de diferentes especies, aunque pueden intercambiarse entre sí. Los modelos de mezclas son los de "los dos estados", "intersticiales", "de cúmulos" (clusters), etc. (Grigera, 1976).

Se han analizado distintos esquemas para tratar de encontrar el modelo estructural del agua líquida. Entre las estructuras estudiadas, el modelo de "ice-I-lattice" es uno de los más promisorios y es el que se muestra en la Figura 56 (Narten y col., 1967).

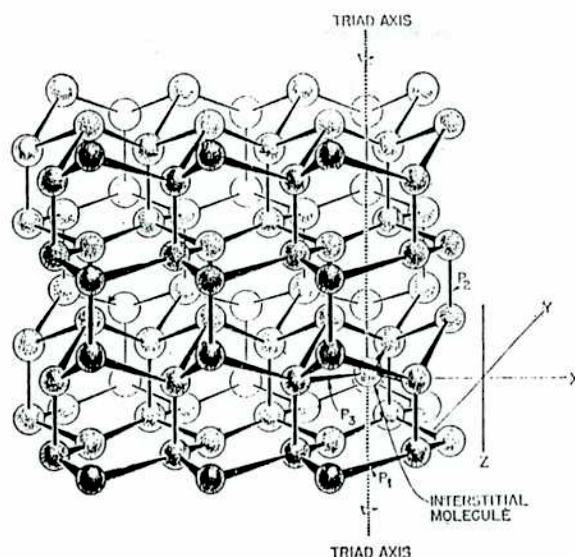


Fig. 56. El modelo del agua. La relación entre los tamaños de las esferas y los radios no está en escala (Narten y col. 1967).

Cada átomo de oxígeno, uno cualquiera de los cuales es tomado como origen, está tetrahédricamente rodeado por otros átomos de oxígeno, formando capas constituídas por anillos plegados de seis miembros. Dos capas adyacentes, relacionadas por simetría especular, forman cavidades dodecahédricas.

El modelo estructural del agua líquida fue desarrollado en base a explicar los datos de difracción de rayos X, y la concordancia entre las funciones de distribución radial (Figura 57) y las funciones de intensidad reducida (Figura 58) registradas para el modelo, y aquellas derivadas del experimento es muy buena, lo que hace al modelo defendible (Narten y col., 1967).

El espacio promedio en la función de distribución radial de moléculas alrededor de una simple molécula, es similar a aquél mostrado por una estructura cristalina líquida de hielo (ice-I-lattice). En la función de distribución radial para el agua (Fig. 57) se observa que, al aumentar la temperatura, disminuye la probabilidad de encontrar espaciamentos entre 4,5 - 5,3 Å hasta 75°C, donde este pico casi ha desaparecido (Suggett, 1975).

En las curvas correspondientes a las funciones de intensidad reducida (Fig. 58), los máximos alrededor de 4,5 y 7 Å correspondientes a interacciones vecinas, se distinguen bien a temperatura ambiente pero desaparecen gradualmente con el incremento de la temperatura. No hay evidencia de una ruptura violenta en la estructura del agua; sí tienen lugar cambios en la configuración promedio alrededor de cualquier molécula de agua, ellos deben ocurrir gradualmente con el incremento de la temperatura (Narten, 1967).

Al agregar al agua un hidrato de carbono u otro humectante ocurrirá entonces una modificación del medio estructurado, la que dependerá de la interacción soluto-solvente que resulte.

Taylor y Rowlinson (1955) observaron que los puentes de hidrógeno entre las moléculas de azúcar y de agua son más fuertes o más extensivos que aquéllos entre moléculas de agua solamente. En base a esto, resulta que se puede definir un número de hidratación para cada azúcar, según lo hicieron Stokes y Robinson, en base a:

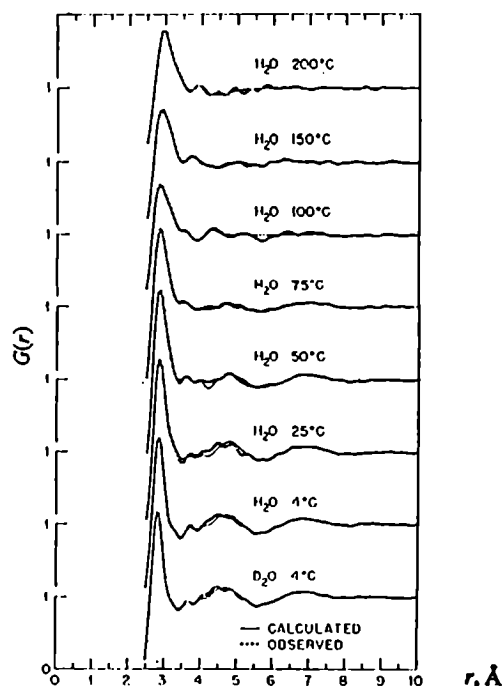
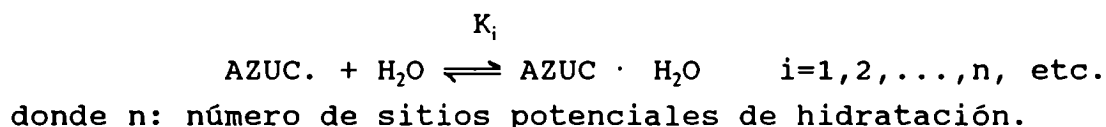


Fig. 57. Funciones de distribución radial del agua (Narten y col., 1967).

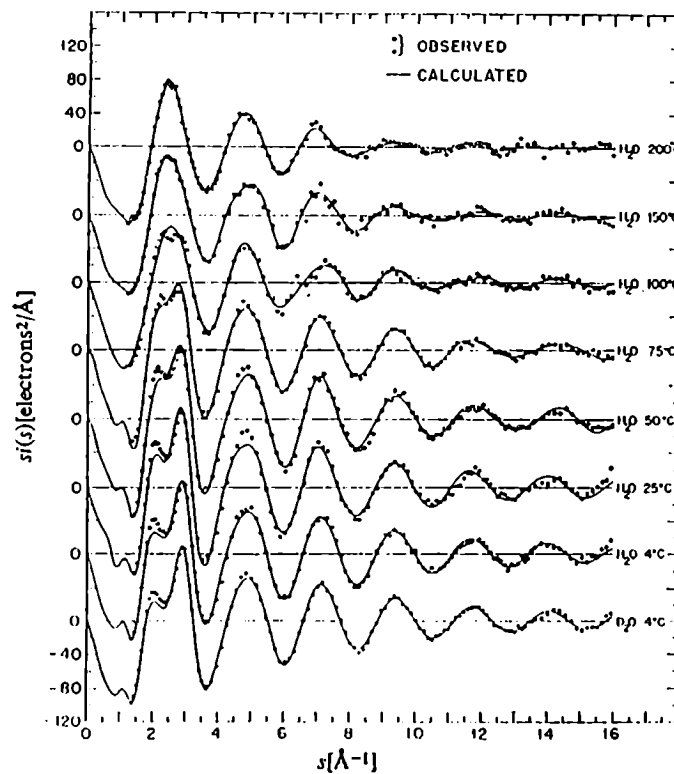


Fig. 58. Intensidades reducidas para el agua líquida (Narten y col., 1967).

Suggett (1975) reportó que la glucosa tiene un  $n$  de 6 y la sacarosa un  $n$  de 11.

Al aumentar la temperatura de 25°C a 60°C, las determinaciones termodinámicas realizadas sugieren que el estructuramiento de moléculas de agua alrededor de una molécula de glucosa conduce a una asociación que es térmicamente más estable que cualquier otra asociación de moléculas de agua con sacarosa o entre moléculas de agua en sí mismas. La mayor fuerza de asociación de la hexosa podría, aparentemente, compensar el mayor número de sitios potencialmente formadores de puentes de hidrógeno que posee cada molécula de sacarosa (Taylor y Rowlinson, 1955).

Se debe destacar que en una misma molécula de un soluto dado, todos los sitios de hidratación no son equivalentes. Los hidroxilos ecuatoriales son más fuertemente hidratados que los axiales. La naturaleza y extensión de la hidratación de los azúcares depende, entre otras cosas, de su estereoquímica. Así, la molécula de  $\beta$ -D-glucosa (que es el conformero que abunda más en medio acuoso respecto de la forma  $\alpha$ ) reemplazaría casi exactamente una conformación "silla" en la estructura de red del agua (Suggett, 1975). En



la Fig. 59 se observa un esquema de este evento y corresponde a una vista superior de la estructura de "ice-I-lattice" correspondiente al agua pura (Fig. 56). Se observa que la molécula de  $\beta$ -D-glucosa necesita la separación de 4,9 Å en el medio acuoso estructurado.

El aumento de temperatura va haciendo desaparecer paulatinamente la probabilidad del espaciamento 4,5 - 5,3 Å, hasta que el pico correspondiente de la función de distribución radial (de rayos X) desaparece al llegar a 75°C (Fig. 57). Esto significa que a partir de esta temperatura ya no habría un buen "anclaje" de la molécula de  $\beta$ -D-glucosa a la estructura tetrahédrica del agua, porque ocurrió la paulatina modificación de la estructura del solvente al aumentar la temperatura, o mejor dicho, el aumento de temperatura por encima de cierto grado "fluidifica" tanto la estructura del H<sub>2</sub>O como la de las moléculas de  $\beta$ -D-glucosa.

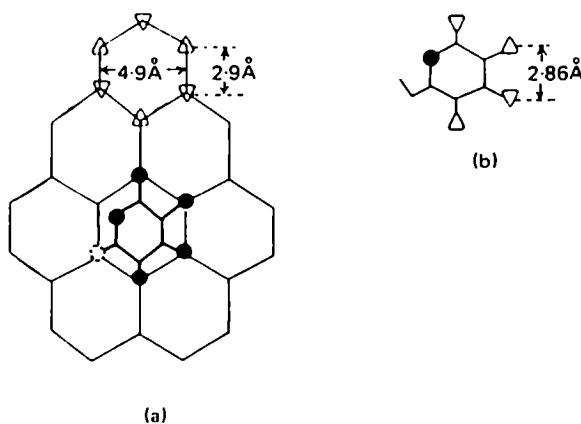


Fig. 59. Modelo posible para la hidratación de monosacáridos. (a) Estructura "ice-I-lattice" o "tridimita" del agua, a 25°C. (b)  $\beta$ -D-glucosa. La orientación de los triángulos indican si un átomo de oxígeno está por encima o por debajo del plano del anillo (Suggett, 1975).

Según comenta Suggett (1975), esto ha sido demostrado por los estudios de Tait y col. Ellos investigaron la hidratación de los monosacáridos usando determinaciones de tiempos de relajación de spin-spin a partir del análisis por RMN de  $^{17}\text{O}$ . Se graficó el ancho de banda de una única línea -  $^{17}\text{O}$  ( $\Delta\nu$ ) en función de la inversa de la temperatura (Fig. 60), donde  $T_2$  es el tiempo de relajación de spin-spin (transversales) del  $^{17}\text{O}$  para soluciones acuosas de cuatro monosacáridos: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa y D-ribosa, con el objeto de obtener información acerca de las propiedades del componente acuoso

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi \cdot T_2}$$

Como el ancho de línea de una señal de RMN depende adicionalmente de la inhomogeneidad del campo magnético estático ( $\Delta H_0$ ), resulta que el ancho de banda ( $\Delta\nu$ ) observado debe ser corregido para conocer el  $\Delta\nu$  correspondiente a la interacción que interesa.

En la Figura 60 se observa que a las más bajas temperaturas hay una clara diferencia entre las propiedades de hidratación de las tres hexosas (con cinco hidroxilos en su molécula) y las de la ribosa (con cuatro hidroxilos). A temperaturas por encima de  $75^\circ\text{C}$ , en realidad los tiempos de relajación transversales  $T_2$  de todos los monosacáridos en agua son indistinguibles. Examinando las amplitudes de los procesos de relajación, se puede estimar la cantidad de agua cuya movilidad ha sido significativamente modificada por el soluto. A partir de estos datos, la D-glucosa parecería hidratada por seis moléculas de agua por molécula de la hexosa (a  $5^\circ\text{C}$ ), mientras que la D-ribosa está mucho menos hidratada (2 a 3 moles de agua/mol de pentosa, a  $5^\circ\text{C}$ ). No sólo el número de hidroxilos, sino fundamentalmente la conformación de la molécula de azúcar influencia sus propiedades de hidratación. Mientras la  $\beta$ -D-glucosa tiene todos sus hidroxilos en configuración ecuatorial y en consecuencia ajusta muy bien en el arreglo tetrahédrico de las moléculas de agua, la conformación de la D-ribosa

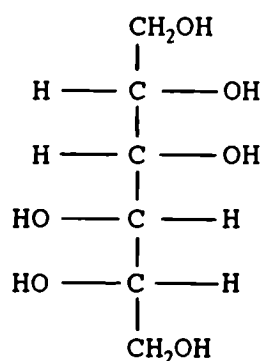
(furanosa o piranosa) no ajusta tan bien en la estructura del solvente. Conforme la temperatura aumenta, las diferencias entre las propiedades de hidratación de la D-glucosa y de la D-ribosa van desapareciendo gradualmente, pues gradualmente se va modificando la estructura del solvente, como ya fuera comentado. Desde ya que también la conformación "silla" del azúcar se distorsiona con el aumento de la temperatura, pues se observa cómo las propiedades de rotación óptica de estos monosacáridos en agua, tienden a valores semejantes a los que presentan en medio no acuoso (Suggett, 1975).

Si el arreglo tetrahédrico de las moléculas de agua es denominado componente "estructurado" (estr.) de un modelo acuoso constituido por dos estados en equilibrio:

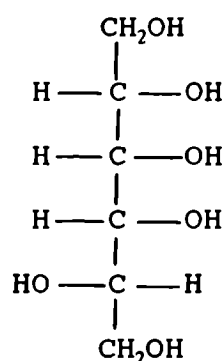


entonces podríamos suponer que la D-ribosa interactúa fundamentalmente con el componente menos estructurado ( $\text{H}_2\text{O}$  densa) y, como la urea, actuaría como un **"disruptor de estructura"** del solvente, o dicho de otra manera, la D-ribosa perturbaría el equilibrio (16) desplazándolo de manera que aumenta la proporción de agua menos estructurada (Inhat y col., 1968). La D-glucosa y la sacarosa son, en cambio, **"formadores de estructura"** o forma "ice-I-lattice" en el agua adyacente a la molécula del mono-sacárido. Una molécula de glucosa forma además puentes de hidrógeno simultáneamente con moléculas de agua que se encuentran por encima y por debajo del plano de la molécula de la hexosa (Figs. 61 y 62) (Suggett, 1975).

Manitol y sorbitol son polioles estereoisómeros que se diferencian solamente en la posición de uno de sus seis grupos hidroxilo:



MANITOL



SORBITOL

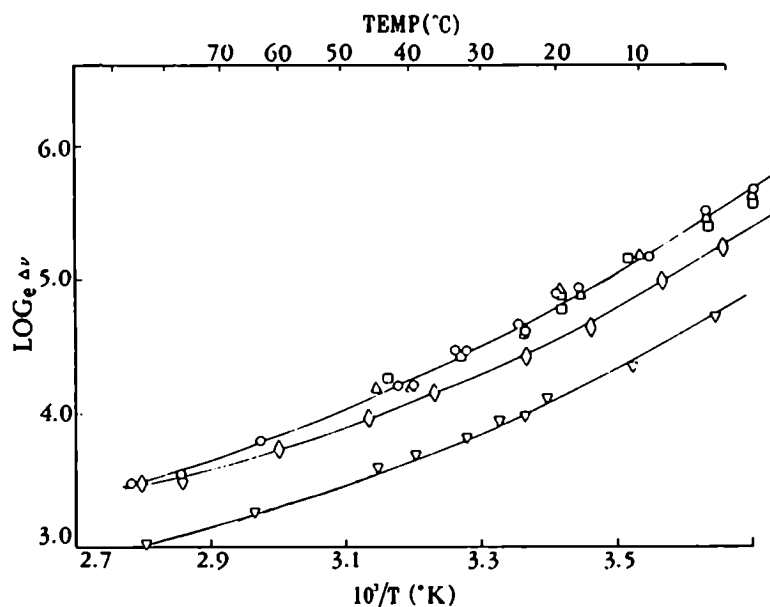


Fig. 60. El ancho de líneas del  $^{17}\text{O}$ , corregido por inhomogeneidad, como una función de la temperatura. ( $\nabla$ ) agua; ( $\diamond$ ) 2,69 m de D-ribosa; ( $\triangle$ ) 2,79 m de D-galactosa; (O) 2,79 m de D-glucosa; ( $\square$ ) 2,79 m de D-manosa (Tait y col., reportado por Suggett, 1975).

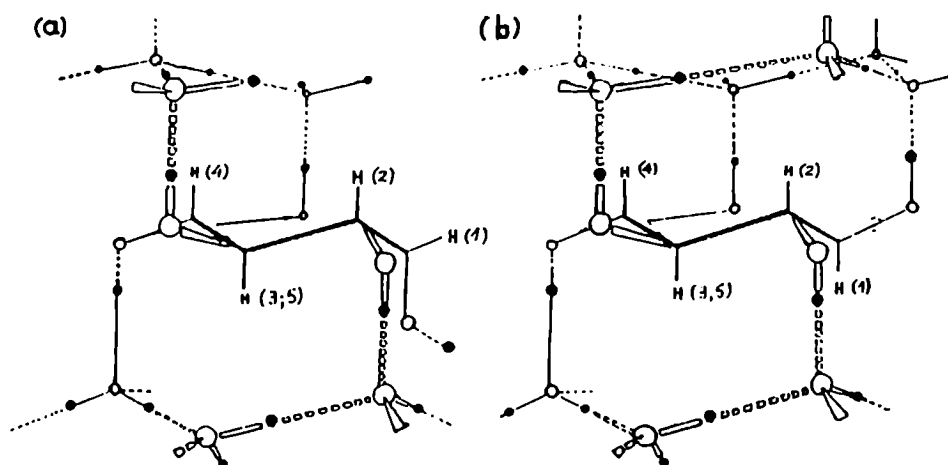


Fig. 61. Puentes de hidrógeno para la D-glucosa dentro de la estructura tetrahédrica del agua, de acuerdo al modelo de hidratación específico. Se muestran las moléculas de agua ubicadas por debajo y por encima del plano del anillo del azúcar. (a) forma  $\alpha$ ; (b) forma  $\beta$  (Suggett, 1975).

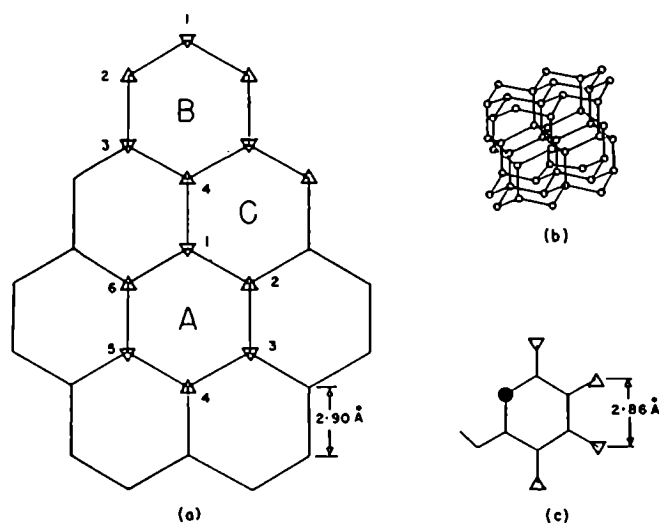


Fig. 62. (a) Un plano de la estructura "tridimite" del agua mostrando la dirección de los puentes de hidrógeno. (b) La estructura de "tridimite". (c) La molécula de D-glucosa mostrando la dirección de posibles puentes de hidrógeno perpendiculares.

Sin embargo, en solución acuosa las propiedades de ambos son bastante diferentes, debido a específicas interacciones de cada uno con el agua. Grigera (1988) estudió el efecto del solvente sobre la conformación del sorbitol y del manitol haciendo una simulación por dinámica molecular de ambos polioles en el vacío y en el agua. Encontró que el **"tiempo (lifetime) de hidratación"** es más representativo de las propiedades de hidratación que un mero recuento de moléculas de agua alrededor de una molécula de soluto. Según esto, definió el parámetro R, como:

$$R = \frac{\tau_i}{\tau_w}$$

donde  $\tau_i$  es el tiempo promedio de permanencia de las moléculas de agua cerca del poliol, mientras que  $\tau_w$  es el tiempo promedio de permanencia de una molécula de agua cerca de otra molécula de agua. Ambas sustancias tiene  $R < 1$ , lo que define una hidratación negativa, pero con valores diferentes:

$$R \text{ (manitol)} = 0,80$$

$$R \text{ (sorbitol)} = 0,39$$

En agua como solvente, el manitol tiene configuración planar zig-zag, mientras que la del sorbitol es "bent" (Fig. 63). Se concluyó que es el solvente el que determina las configuraciones del manitol y sorbitol en agua, es decir, que aquéllas dependerán de la interacción soluto-solvente. Ambos polioles poseen hidratación negativa y, en consecuencia, esto indicaría que ambos son **"disruptores de la estructura"** del solvente agua, siendo el sorbitol bastante más "destructor", según la jerga usada comúnmente para clasificar a los solutos en su relación con el agua.

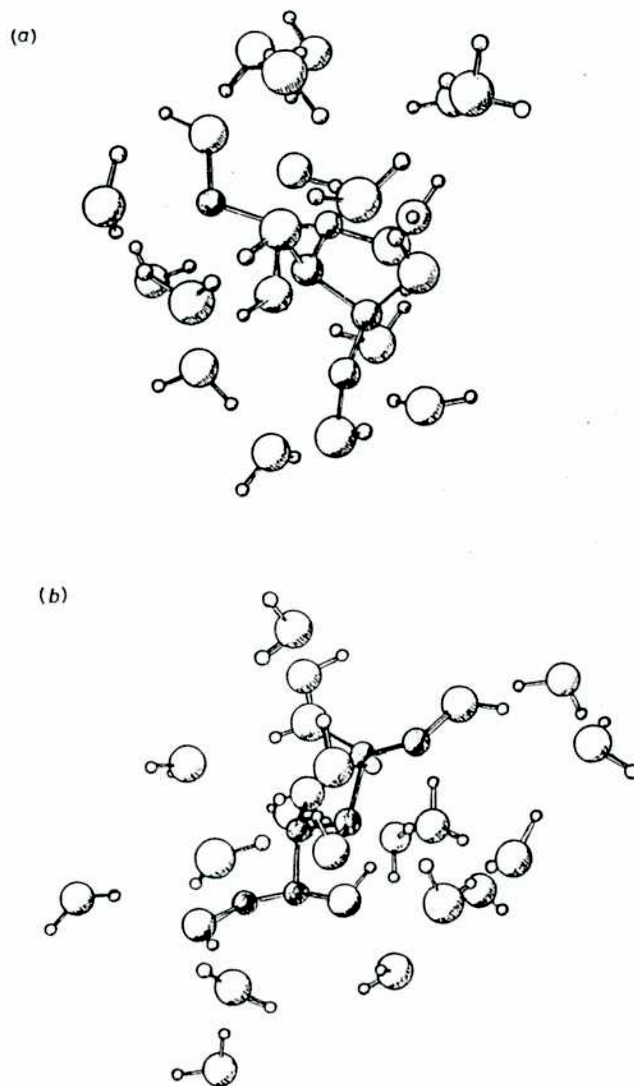


Fig. 63. Conformaciones de equilibrio de los sistemas sorbitol-agua (a) y manitol-agua (b). Uno puede claramente ver la conformación "bending" del sorbitol y la conformación planar zig-zag del manitol. Se muestran sólo unas pocas moléculas de agua (Grigera, 1988).

Se sabe que la solubilidad es debida a la hidratación del soluto, esto es, a la formación de puentes de hidrógeno que resultan de las interacciones entre el soluto y el agua, y que son más fuertes que aquéllas que ocurren entre moléculas de soluto o entre moléculas de solvente (Franks, 1969). Partiendo de esta premisa, todo azúcar (o poliol) soluble en agua lo es por dicha causa y, como se ve en la Fig. 60, esto se manifiesta por una disminución del tiempo de relajación transversal  $T_2$  en las moléculas del componente acuoso. Existen azúcares que interactúan mejor con el agua "estructurada" y, por lo tanto, disminuyen más el tiempo de relajación transversal  $T_2$  (glucosa, manosa, galactosa). Son los que interactúan con el  $H_2O$  "estr." (estructurada) en el equilibrio (16) y, por lo tanto, lo desplazan de manera de aumentar el agua estructurada. En cambio, aquellos azúcares que interactúan menos con el agua "estructurada" y, por lo tanto, disminuirían menos el tiempo de relajación transversal  $T_2$  (ribosa), son los llamados disruptores de la estructura del  $H_2O$  porque **aumentan menos** el componente "estructurado" del equilibrio (16), en consecuencia hay más componente no estructurado  $[(H_2O)_d]$ .

O sea que a temperaturas menores a  $70^\circ-75^\circ C$ , se manifiesta perfectamente el agua líquida como solvente netamente estructurado, resultante del equilibrio planteado en (16) y que, si a ello le agregamos humectantes, como hidratos de carbono o polioles, se manifestará el comportamiento de éstos como "**formadores**" o "**disruptores**" de estructura según la interacción humectante-agua y, en consecuencia, se desplazará el equilibrio antes citado (16).

En realidad, esta terminología de "formadores" y "disruptores" de la estructura del agua, tan tradicionalmente usada, es discutible. Si se analiza la Fig. 60, se observa que el agregado de cualquier humectante produce la disminución (en mayor o menor grado) del tiempo de relajación transversal ( $T_2$ ) del agua. Aquellos azúcares que fueron "rotulados" como "formadores de estructura" dan un ancho de línea ( $\Delta\nu$ ) mayor que aquellos que fueron "rotulados" como



"disruptores de estructura" del agua, y todos ellos tienen un  $\Delta v$  mayor que el del agua pura.

En los sistemas modelo estudiados en el presente trabajo, cuando hay glucosa presente ésta interactúa en mayor medida con el agua pues la conformación silla de dicha hexosa "encaja" mejor en la red estructural del agua (solvente). Usando la terminología de Grigera (1988), el tiempo promedio de permanencia de las moléculas de agua cerca de la glucosa sería mayor que el tiempo promedio de permanencia de una molécula de agua cerca de otra molécula de agua. En cambio, cuando se usa sorbitol en reemplazo de la glucosa, al tener conformación "bent", no interacciona con el agua en igual medida, por lo que ésta permanecerá más tiempo cerca de otras moléculas de agua que cerca de las moléculas de sorbitol (R menor a 1).

De esta forma se podría decir que la entidad denominada "SOLVENTE" en nuestros sistemas, estaría en realidad constituida por la estructura del medio "dispersante" o "vehículo" en la solución, esto es la **asociación H<sub>2</sub>O - AZUCAR**. La interacción de los azúcares con el agua determina su comportamiento bioquímico. Así, según la situación, podrán actuar como estabilizadores de distintas reacciones químicas que se producen en su seno (Suggett, 1975).

Si observamos la Tabla 24 de constantes de velocidad de destrucción del AAs entre 24° y 45°C, vemos que éste se destruye más rápidamente en el sistema **sin** humectante o control (K). Evidentemente el agua es el solvente en el que se ve totalmente favorecida la destrucción anaeróbica del AAs. El agregado de sorbitol al agua (sistema D) deja menos agua "disponible" para interactuar con el AAs, ya que dicho solvente también debe interactuar con el sorbitol. En este medio, el AAs se destruye a menor velocidad que en el anterior sistema.

La presencia de glucosa en el agua (sistema A) provoca que el solvente interactúe muy fuertemente con este humectante, según lo ya explicado y, por lo tanto, habrá aún menos agua "disponible" para interactuar con el AAs (menor

tiempo promedio de permanencia de una molécula de agua cerca de otra molécula de agua). De esta manera, aún existiendo igual actividad de agua (0,94) en los tres sistemas con humectante (A, D, E), el agua realmente "disponible" dependerá en realidad del tipo de humectante presente y, más concretamente, de la interacción resultante **humectante-solvente** debida a la conformación molecular del primero, adoptada de acuerdo a la influencia que sobre él ejerce la disposición estructural del solvente.

Al pH 3,5 en que se trabajó, la sacarosa se hidroliza a glucosa y fructosa, por lo que en medio ácido será la presencia de estos azúcares la que influirá más que la sacarosa en sí que pueda aún existir como tal en este medio. El efecto estabilizante de la sacarosa remanente y de la glucosa formada en su relación con el agua, determinarían evidentemente un saldo positivo para la preservación del AAs en tales condiciones, entre 24° y 45°C, aún cuando la fructosa interaccione considerablemente menos con el agua que aquéllos dos. Según la jerga tradicional, la fructosa sería considerada como "disruptora" de la estructura del agua (Mathlouthi y Seuvre, 1988).

A temperaturas mayores a 70°-75°C ya resulta indistinguible el carácter "disruptor" o "formador" de la estructura del agua, por disminuir considerablemente la hidratación de los azúcares y polioles, debido a la distorsión de sus conformaciones y de la estructura "ice-I-lattice" del agua. En consecuencia, aquí no se manifestaría el efecto estabilizante diferencial de los humectantes.

En la Fig. 60 se observa justamente esta no diferenciación de los tiempos de relajación transversal ( $T_2$ ) entre los diferentes azúcares, por encima de los 70°C. Así, en el presente trabajo, entre 70° y 90°C, no hay diferencias significativas entre las velocidades de destrucción del AAs en los sistemas modelo sin humectante (K) y con sorbitol (D). En cambio, el AAs se destruye más rápidamente en los medios con glucosa (sistema A) y más aún en aquél con sacarosa (sistema E) porque éstos contribuyen con su propio deterioro

a través de reacciones de pardeamiento no enzimático, las que desplazarían los equilibrios que pudieran existir en la compleja ruta de degradación del AAs per se, por acción de masas, y como ya fuera oportunamente discutido: en el caso del sorbitol (sistema D), su baja actividad en el pardeamiento en las condiciones de trabajo, determina que el AAs se destruya más lentamente, al igual que en el sistema control (K).

#### **4.4.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)**

Como ya se mencionó previamente, la cinética de destrucción del AAs total (AAsT) es dependiente de la de degradación del AAs, así como del balance resultante entre la formación y destrucción del DHA. Debido a lo complejo de esta situación, en algunos casos aquí analizados, los resultados de la cinética de destrucción del AAsT no ajustaron ni a orden cero ni a orden uno, que son los habitualmente postulados para el AAs, la especie más comúnmente estudiada (Nagy y col., 1977; Lee y col., 1977; Kincal y col., 1987).

Los sistemas conteniendo hidratos de carbono, además, presentaron problemas a nivel analítico, pues en la etapa de burbujeo de sulfuro de hidrógeno se observaba la precipitación de polímeros y de azufre (elemental) cuando el pardeamiento alcanzado era relativamente intenso, lo que imposibilitaba una adecuada valoración del contenido de vitamina C, determinando la finalización de la experiencia a tiempos menores que los correspondientes al 50% de destrucción de la misma, lo que trae como consecuencia el aumento de la incertidumbre en la determinación del orden de reacción (Labuza y Kamman, 1983). Sin embargo, a las altas temperaturas, los datos de los que se dispone luego de este trabajo son de importancia práctica, pues permiten concluir sobre el efecto de un pretratamiento o de un tratamiento térmico, sobre el nutriente estudiado. Por todo lo antedicho,

y con el fin de determinar el efecto de los humectantes, se decidió comparar los datos a nivel gráfico cada vez que se encontraron órdenes de reacción diferentes. Si bien no se ha podido realizar un riguroso tratamiento cinético, los resultados obtenidos son importantes debido a la escasez de datos en bibliografía sobre variación del contenido de vitamina C.

En la Tabla 27 se presentan los resultados cinéticos obtenidos para el estudio de la destrucción del AAST en los sistemas modelo conteniendo distintos humectantes (A, D y E) y en el sistema control o sin humectantes (K), envasados en condiciones de anaerobiosis (sin cámara de aire).

Comparando para cada temperatura, el sistema control (K) y los sistemas con humectantes (A, D, E) (Tabla 27 y Figs. 64 a 66), puede verse que todos los humectantes ejercen una protección sobre la vitamina C en el rango de temperaturas de almacenamiento (24° a 45°C), siendo los más efectivos la D-glucosa y la sacarosa. En las Figuras 67 a 69 puede verse que, en general, existe un marcado efecto acelerante del aumento de temperatura, en el rango 24°- 45°C, sobre la destrucción de la vitamina C. Sin embargo, haciendo la comparación estadística en aquellos casos en que esto fue posible, se observó que no existió diferencia significativa entre las velocidades de destrucción del AAST a 24° y 45°C para el sistema E que contiene sacarosa.

Debido al diferente ajuste cinético presentado por los sistemas analizados en el rango de bajas temperaturas, no se pudo calcular las energías de activación del proceso de destrucción de la vitamina.

Entre 70° y 90°C, los resultados obtenidos para los sistemas aquí analizados ajustaron estadísticamente a los siguientes órdenes, para la destrucción del AAST: control y sorbitol, orden uno, sacarosa, orden cero y D-glucosa, orden cero a 80° y 90°C, no ajustando ni a cero ni a uno a 70°C.

**Tabla 27. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb) 10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	24	0	mg%/h	3,46 ± 0,59	-- --
	33	1	1/h	0,14 ± 0,03	
	45	1	1/h	0,35 ± 0,02	
	70	NR	mg%/h	29,45 ± 18,61	
	80	0	mg%/h	119,05 ± 12,20	
	90	0	mg%/h	197,62 ± 28,74	
D (Sorbitol)	24	1	1/h	0,38 ± 0,04	-- --
	33	1	1/h	0,76 ± 0,09	
	45	0	mg%/h	28,90 ± 4,23	
	70	1	1/h	1,57 ± 0,16	24 ± 4
	80	1	1/h	3,36 ± 0,25	
	90	1	1/h	11,27 ± 1,17	
E (Sacarosa)	24	0	mg%/h	5,53 ± 0,62	-- --
	33	1	1/h	0,37 ± 0,02	
	45	0	mg%/h	8,53 ± 1,79	
	70	0	mg%/h	123,03 ± 15,58	23 ± 6
	80	0	mg%/h	323,11 ± 18,96	
	90	0	mg%/h	672,42 ± 26,20	
K (Control)	24	0	mg%/h	18,52 ± 1,54	-- --
	33	1	1/h	1,82 ± 0,10	
	45	1	1/h	3,20 ± 0,59	
	70	1	1/h	1,24 ± 0,24	
	80	1	1/h	4,16 ± 0,29	
	90	1	1/h	9,22 ± 0,64	

k: velocidad específica  
 Ea: energía de activación  
 sb: desviación estándar  
 NR: no regresiona

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95):

Sistema A: 33° < 45° 80° < 90°	Temp. 24°C: K > E > A
Sistema E: 24° = 45° < 70° < 80° < 90°	Temp. 33°C: K > D > E > A
Sistema D: 24° < 33° < 70° < 80° < 90°	Temp. 45°C: K > A D > E
Sistema K: 33° < 45° < 70° < 80° < 90°	Temp. 70°C: D = K
33° = 70° 45° = 80°	Temp. 80°C: E > A D = K
	Temp. 90°C: E > A D = K

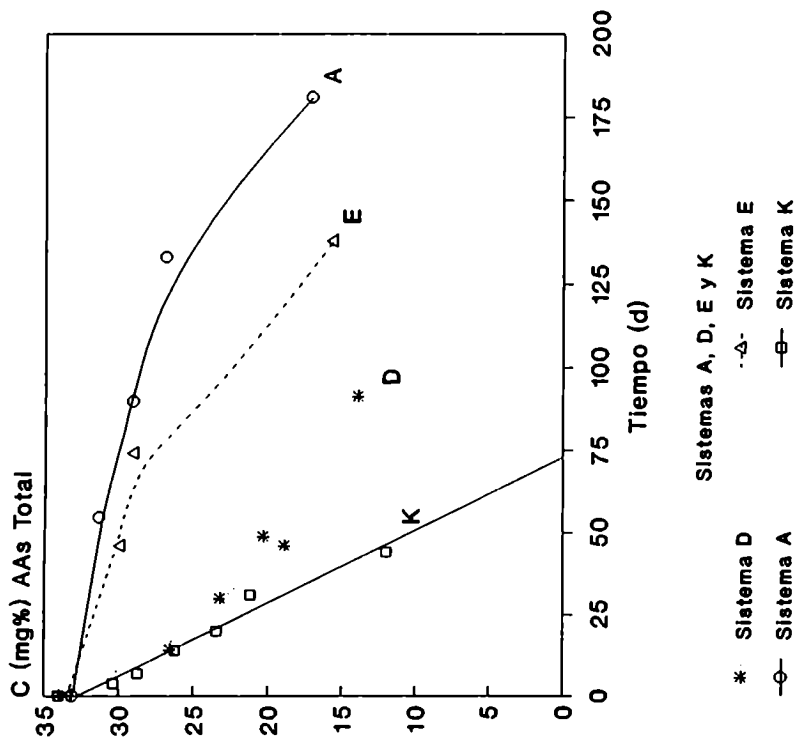


Fig. 64- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) a 24 C, en función del tiempo

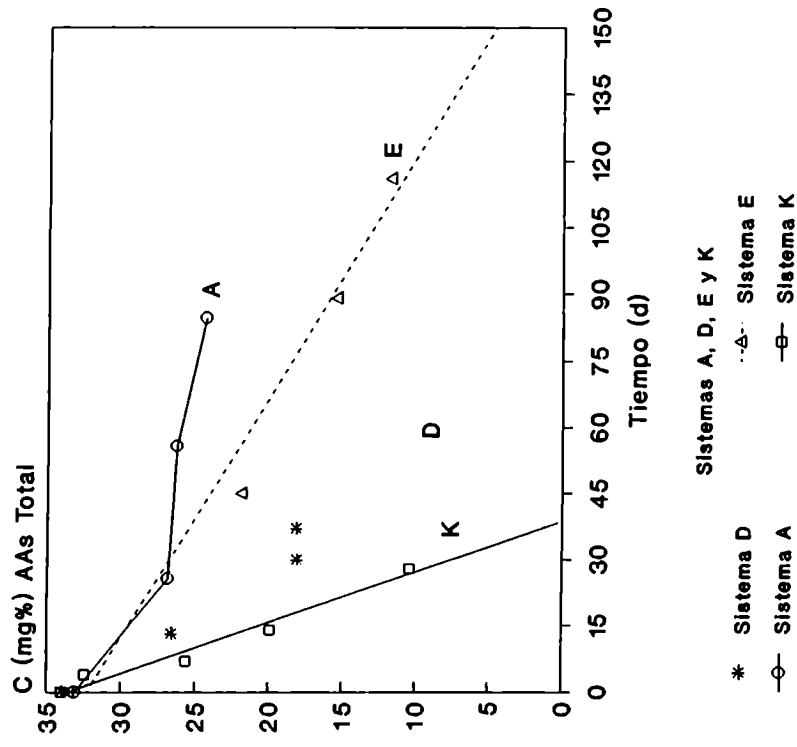


Fig. 65- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) a 33 C, en función del tiempo

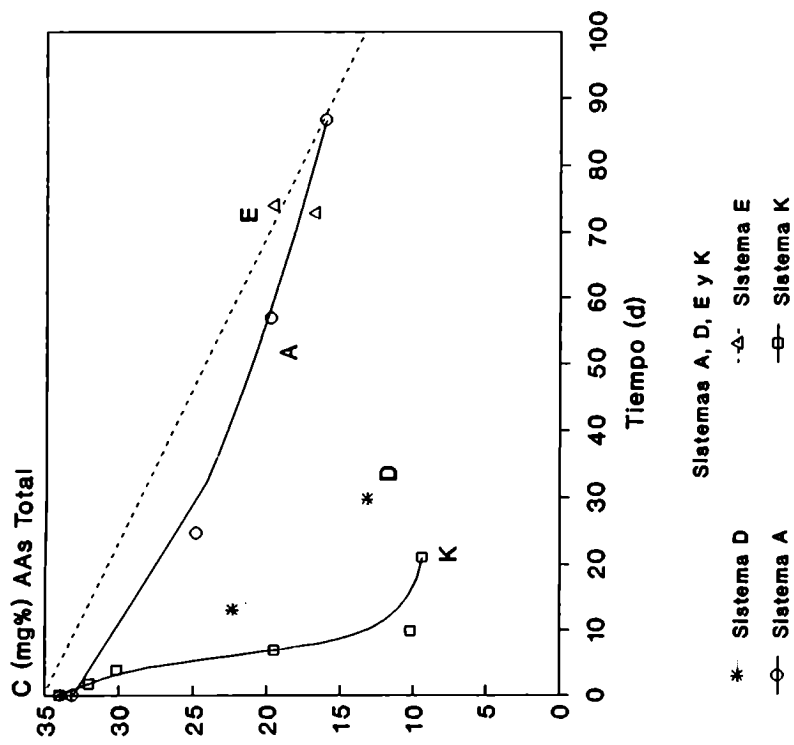


Fig. 66- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) a 45 C, en función del tiempo

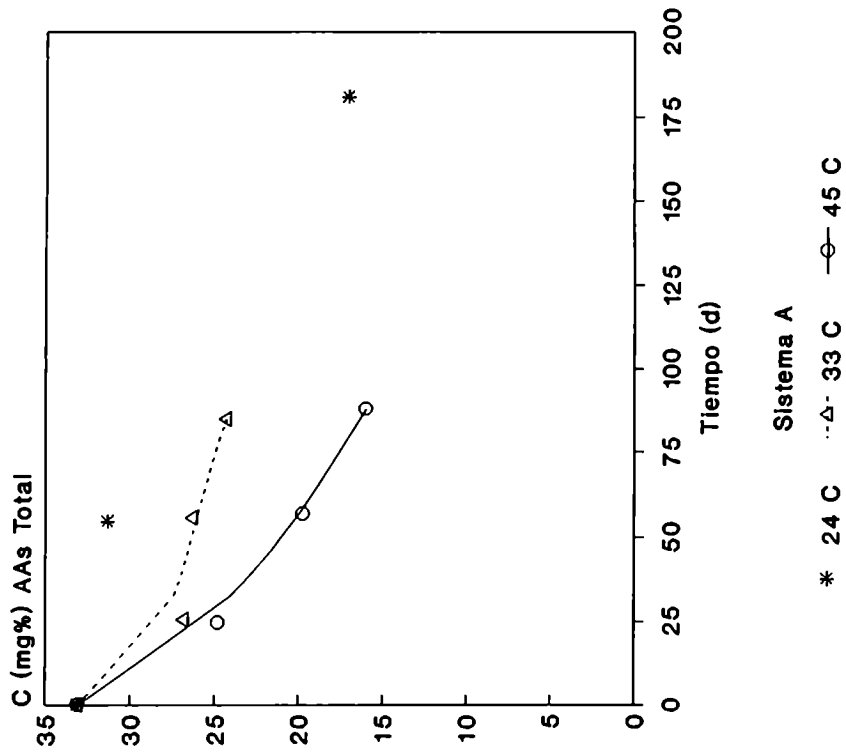


Fig. 67- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) en función del tiempo

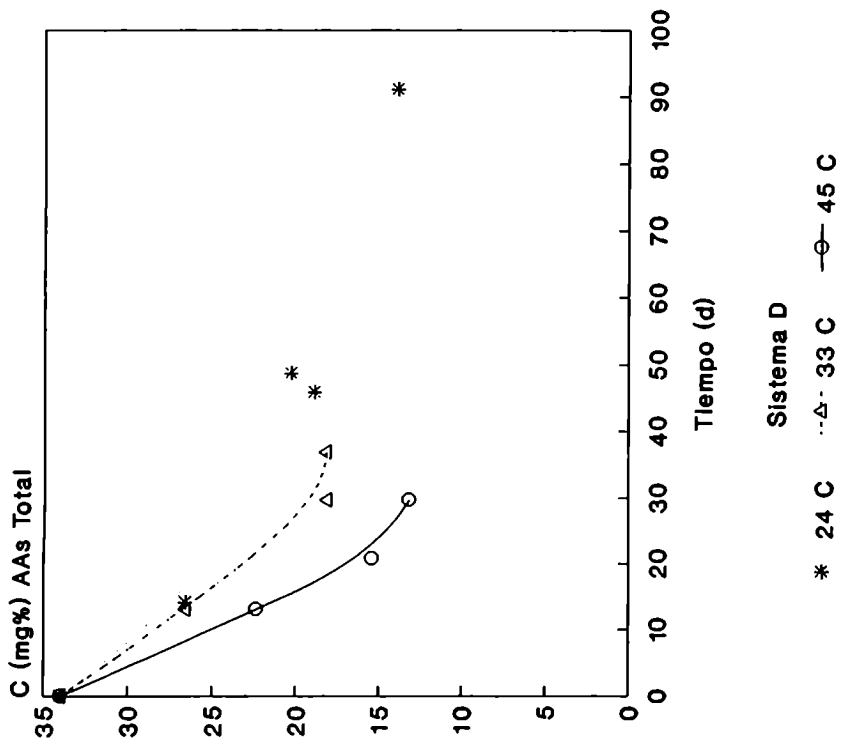


Fig. 68- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) en función del tiempo

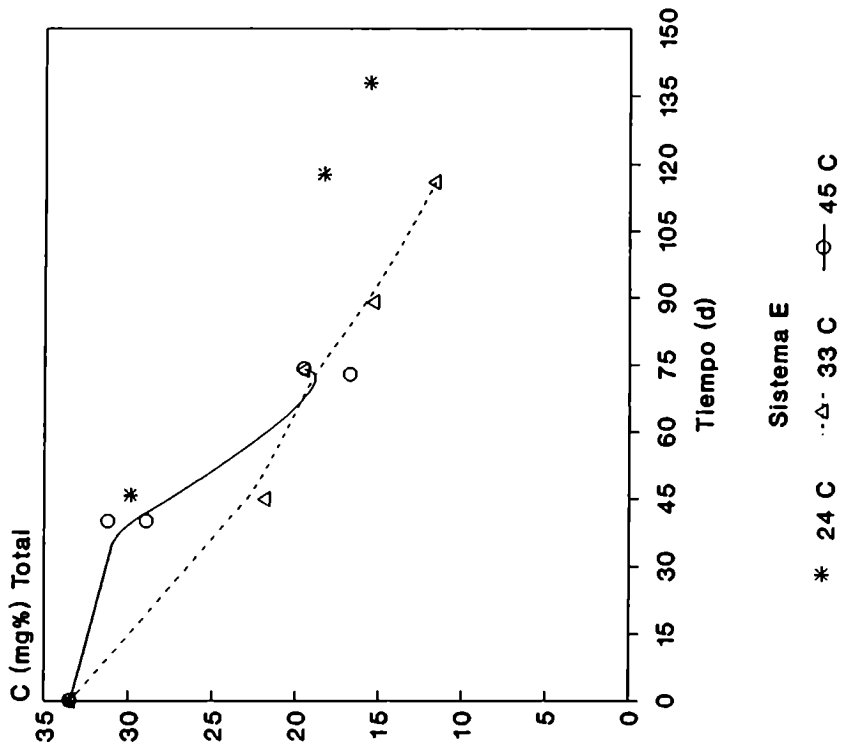


Fig. 69- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) en función del tiempo



En cada uno de ellos, la velocidad de degradación aumenta significativamente ( $P: 0,95$ ), conforme aumenta la temperatura entre  $70^{\circ}$  y  $90^{\circ}\text{C}$ . En el caso del sistema con glucosa (A), la comparación se realiza utilizando el gráfico de la Fig. 70 debido al problema precitado. Es de destacar que el sistema control (K), presenta un comportamiento anómalo en cuanto a la variación de su constante de velocidad con la temperatura en el rango  $24^{\circ}$ - $90^{\circ}\text{C}$  (Figs. 71 y 72). Una tendencia semejante se reportó al analizar el AAs.

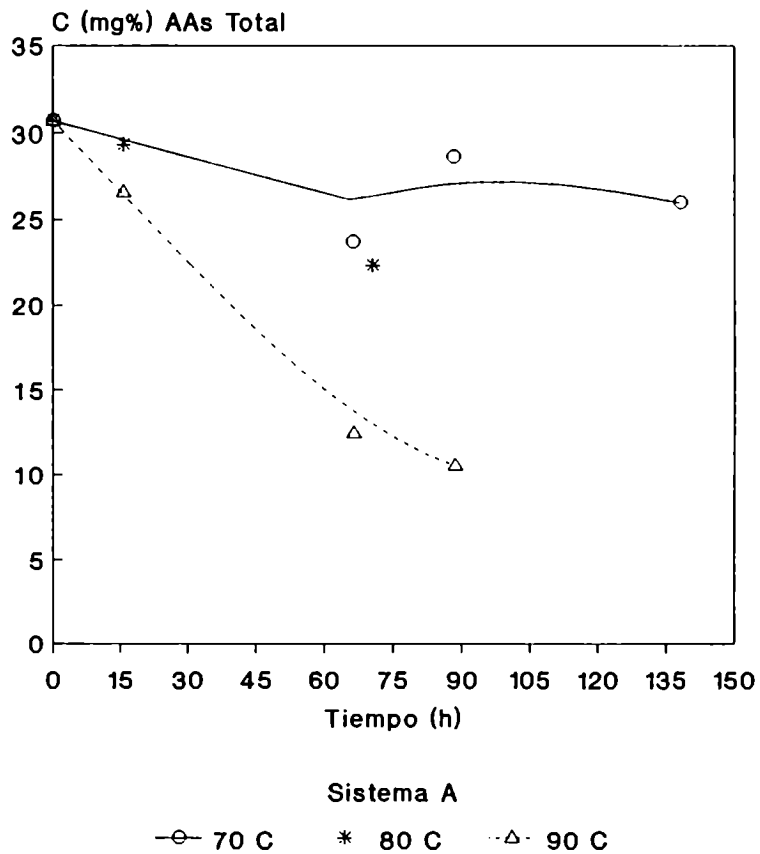


Fig. 70- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) en función del tiempo

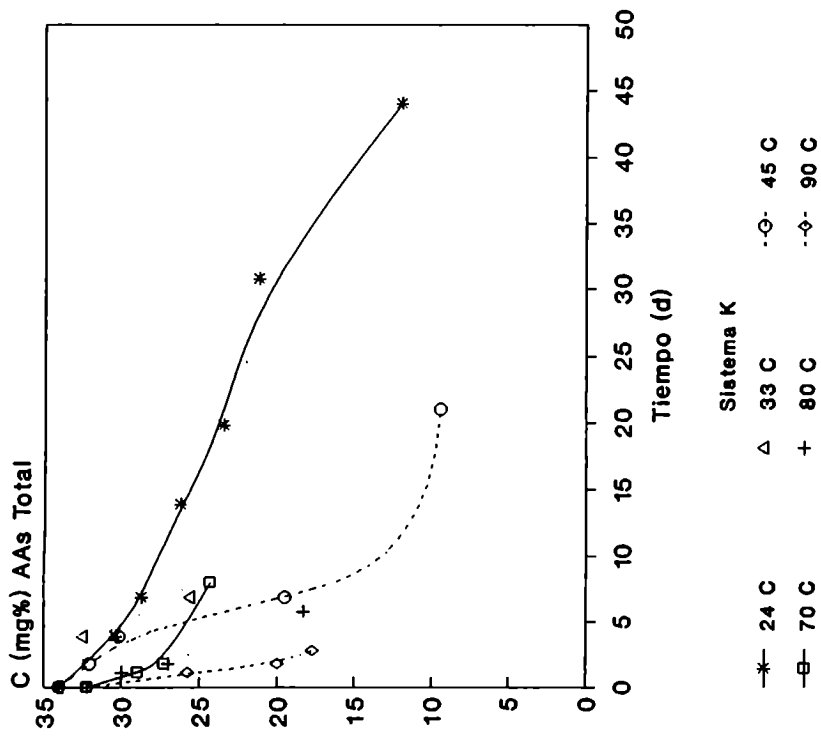


Fig. 71- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) en función del tiempo

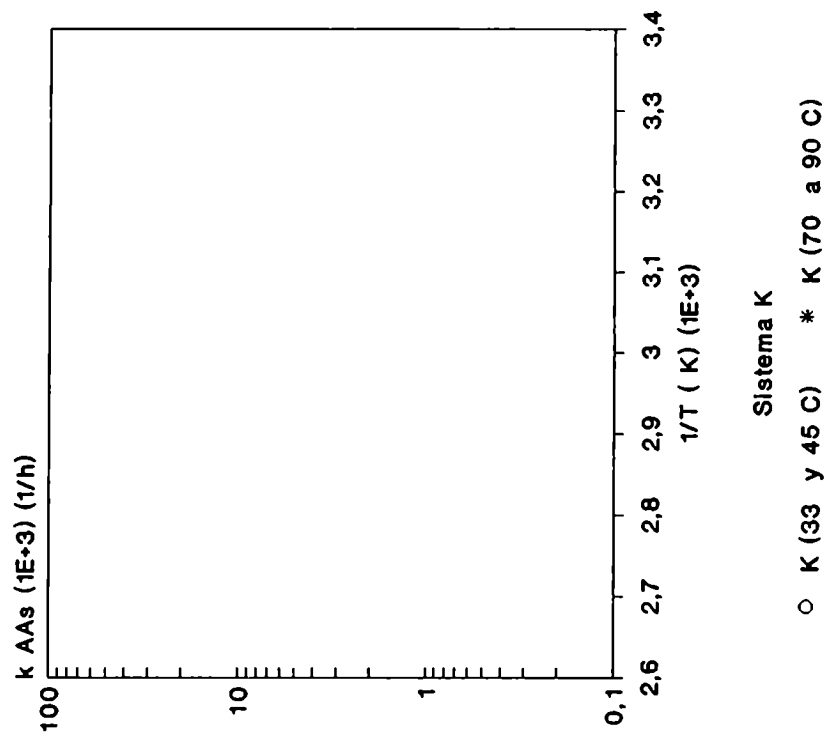


Fig. 72- Variación de la velocidad de destrucción del AAs total (vitamina C) con la inversa de la temperatura

Los sistemas conteniendo sorbitol (D) y sacarosa (E) como humectantes, presentan una relación de tipo Arrhenius de las constantes de velocidad con la temperatura, entre 70° y 90°C y el sistema control (K) no presentó regresión significativa (Tabla 27). Se obtuvieron así energías de activación de alrededor de 23 kcal/mol, valor semejante al obtenido para el AAs. El efecto diferente del sorbitol sobre el AAs en el rango de bajas temperaturas (24°- 45°C) respecto del de altas (70°- 90°C), vuelve a verse aquí sobre el AAST (Figs. 64 a 75).

En cuanto al efecto de los humectantes en el rango 70°- 90°C, como se puede observar en los gráficos de las Figs. 73 a 75, la sacarosa es el único que acelera notablemente la destrucción de la vitamina C. Probablemente, en ello pesen:

- a) la mayor aceleración de la destrucción del AAs por la sacarosa que por la glucosa (ítem 4.4.1), debido a la mayor actividad en el PNE a pH 3,5.
- b) la mayor protección que ejerce la glucosa sobre el DHA (disminución de su velocidad de destrucción a ácido 2,3-DCG) respecto de la sacarosa (Joslyn y Supplee, 1949).

La concentración de DHA se calculó por diferencia:

$$C_{DHA} = C_{AAs\ total} - C_{AAs}$$

La concentración de DHA inicial, que puede o no existir en concentración significativa como para ser detectada por el método de medición usado, deriva de la pérdida inicial de AAs que ocurre (en mayor o menor grado) durante la preparación de los sistemas modelo, debido a la incorporación continua de oxígeno al medio líquido. Esto mismo también ocurriría en la preparación de sistemas reales (Mokady y col., 1984).

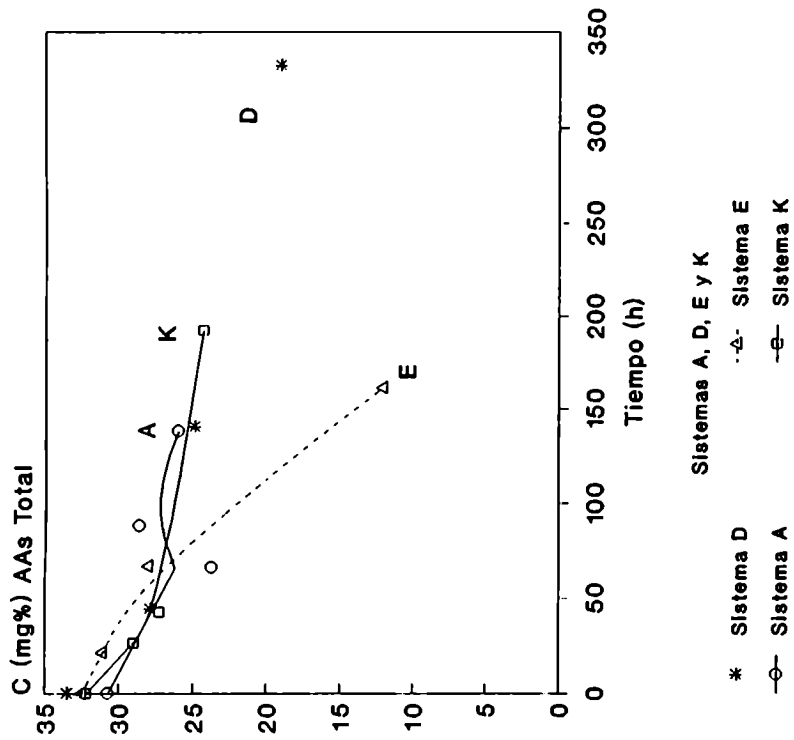


Fig. 73- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) a 70 C, en función del tiempo

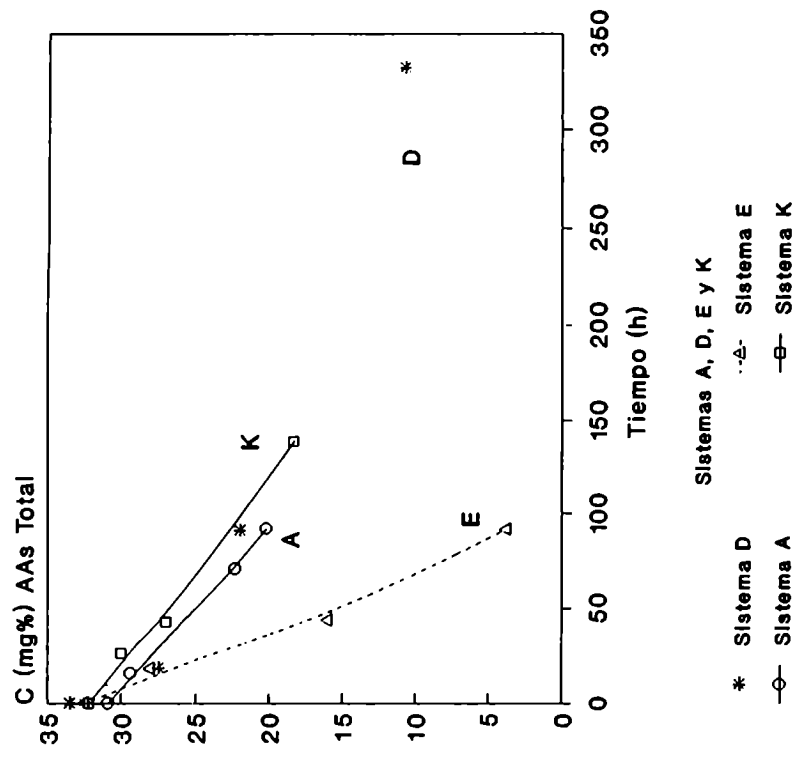
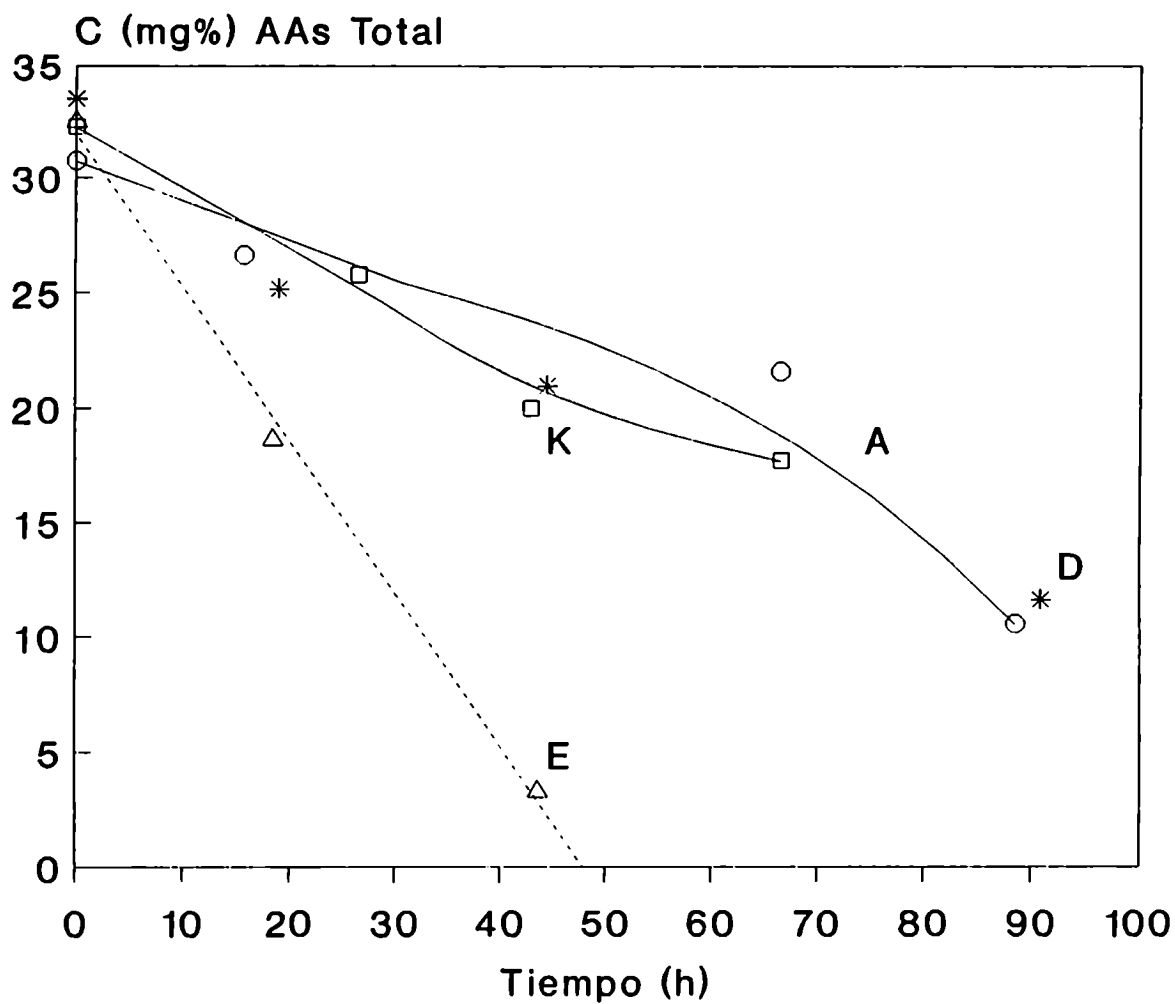


Fig. 74- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) a 80 C, en función del tiempo

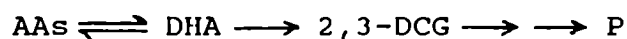


Sistemas A, D, E y K

* Sistema D	--△-- Sistema E
○ Sistema A	—□— Sistema K

**Fig. 75-** Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) a 90 C, en función del tiempo

El DHA formado está, en parte, en equilibrio con el AAs precursor y, en parte, se degrada irreversiblemente a ácido 2,3-dicetogulónico (2,3-DCG), el que luego continúa sufriendo reacciones sucesivas que llevan al pardeamiento del sistema:



Esto significa que la permanencia de DHA durante el tratamiento térmico es testigo de que ocurre la vía oxidativa de destrucción del AAs, a expensas del oxígeno incorporado a los sistemas durante su preparación. El DHA tiene a continuación, su propio mecanismo de desaparición, el que condicionará también su permanencia en el medio acuoso. Joslyn y Supplee (1949) estudiaron la hidrólisis irreversible del DHA a ácido 2,3-DCG en presencia de diferentes azúcares y a dos niveles de concentración de los mismos (20% y 40% en agua), usando además una solución control sin azúcares. La determinación fue realizada a 28,2°C y en un medio de pH 5,0. Los autores concluyeron que la glucosa inhibe la transformación del DHA a 2,3-DCG y que el grado de inhibición producido es mayor cuanto mayor es la concentración del azúcar. A un 40% de concentración, el grado de protección dado por la glucosa es mucho mayor que el dado por la sacarosa, aunque en ambos existe protección con respecto al medio control, o sea, sin azúcares. Si bien las condiciones de los sistemas modelo en el presente trabajo son diferentes a las del de Joslyn y Supplee, también se observó, en general, un mayor tenor de DHA en el sistema con glucosa (36% P/P) que en aquél con sacarosa en condiciones de anaerobiosis y entre 70° y 90°C (Figs. 76 a 78).

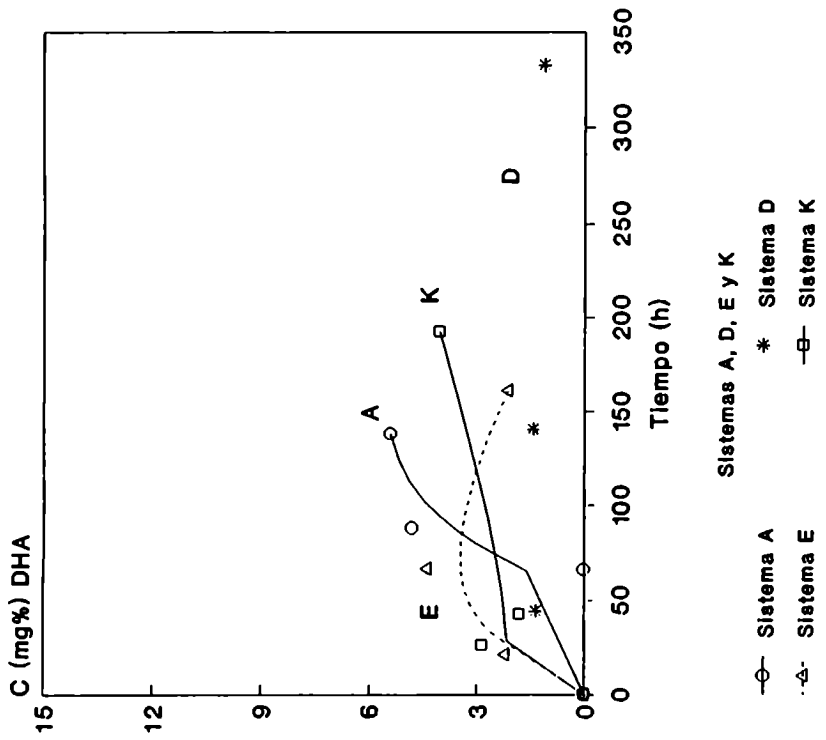


Fig. 76- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, a 70 C

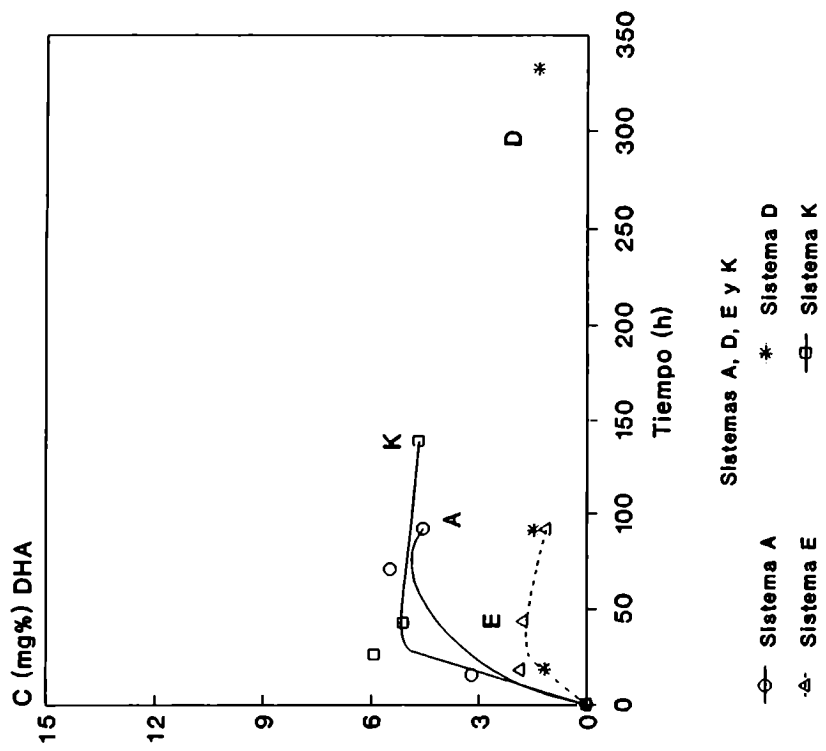
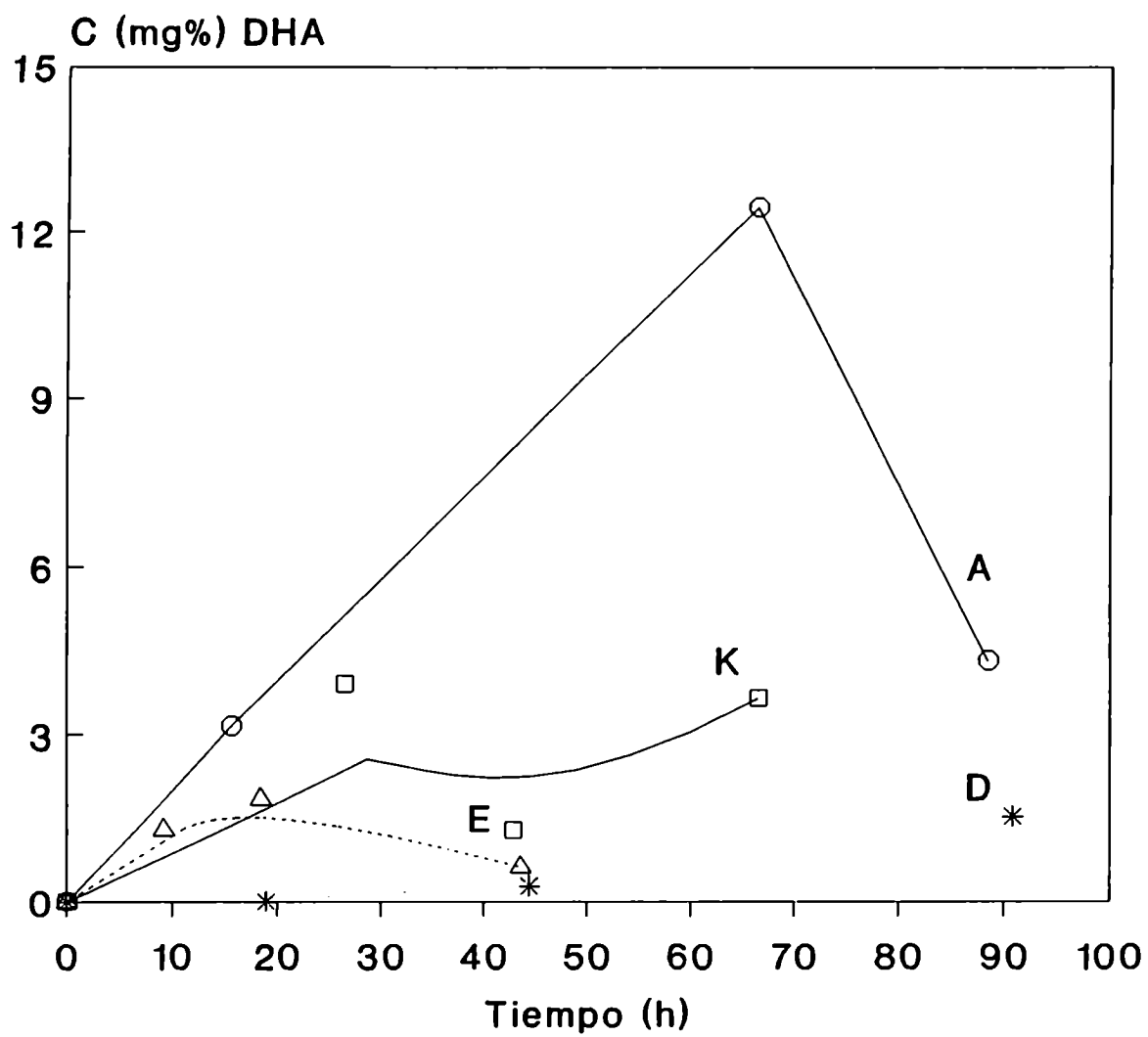


Fig. 77- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, a 80 C



Sistemas A, D, E y K

—○— Sistema A

\* Sistema D

-△- Sistema E

—□— Sistema K

Fig. 78- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, a 90 C



De acuerdo con Joslyn y Miller (1949), la presencia de glucosa o sacarosa disminuye la velocidad de formación de DHA, o sea, la velocidad aeróbica de destrucción del AAs y como ya comentamos, también disminuiría la velocidad de degradación del DHA a ácido 2,3-DCG (Joslyn y Supplee, 1949). Probablemente sea el balance de ambos efectos el que determine la influencia diversa de los hidratos de carbono, a las distintas temperaturas, sobre la cantidad de DHA presente respecto al control (sistema K), tal como se ve en las Figs. 76 a 81.

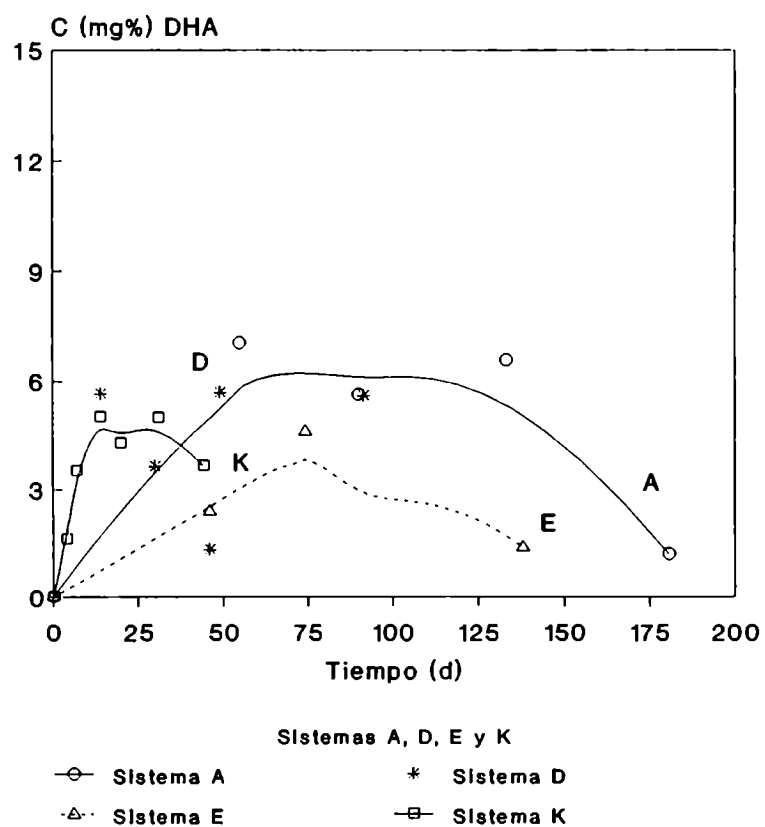


Fig. 79- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, a 24 C

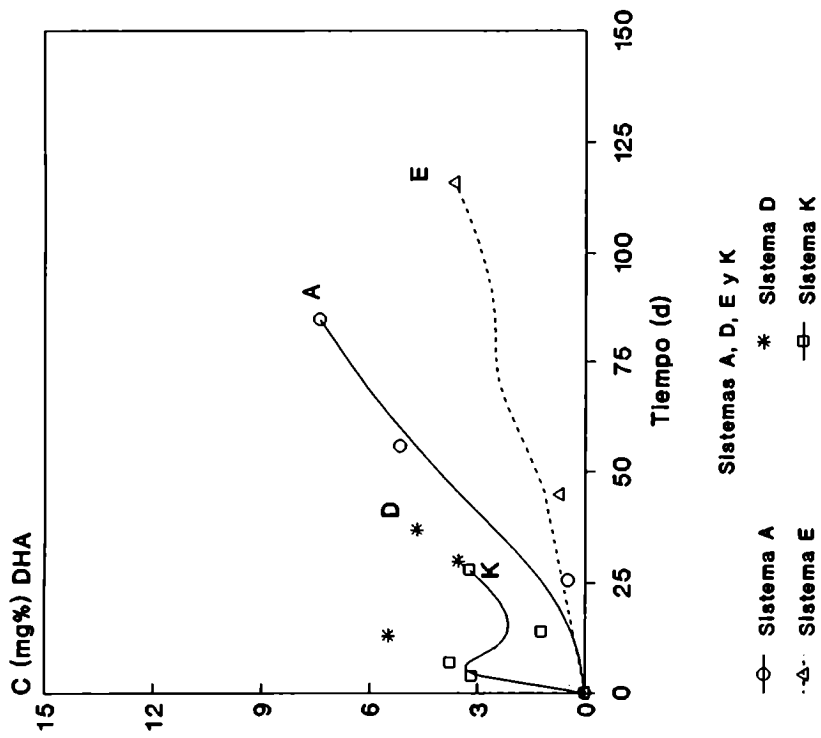


Fig. 80- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, a 33 C

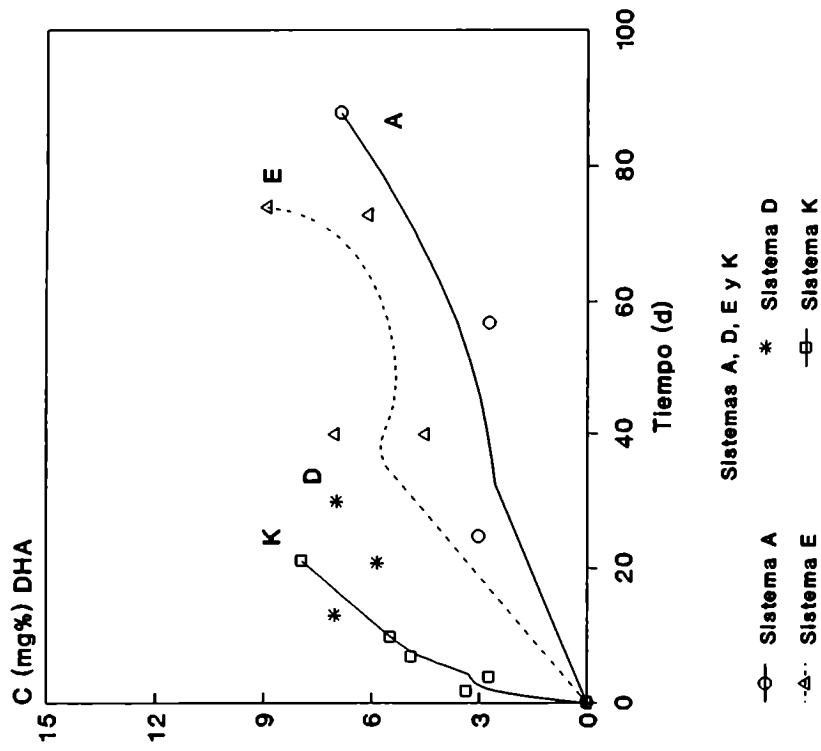


Fig. 81 - Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, a 45 C

En los sistemas A y D a 45°C y en el primero de ellos, a 90°C, el DHA persiste a una concentración casi equivalente a la del AAs remanente hacia el final del lapso estudiado. Debemos destacar, sin embargo, que a 45°C el sistema sin humectantes (K) presenta a los veinte días una concentración de DHA mayor que la de AAs remanente.

#### **4.5. EFECTO DEL AGREGADO DE DISTINTOS AGENTES ANTIMICROBIANOS**

##### **4.5.1. Acido ascórbico**

El **ácido sórbico** tiene una participación importante como agente antimicrobiano en el desarrollo de alimentos estables de humedad alta o intermedia. La actividad acuosa de estos alimentos es lo suficientemente baja como para controlar el crecimiento bacteriano, pero no el de hongos y levaduras, por lo tanto el sorbato se usa como agente antimicótico muy efectivo. El ácido sórbico y su sal de potasio son las formas más utilizadas de los compuestos que reciben, colectivamente, el nombre de "sorbatos". El Código Alimentario Argentino (CAA) permite el uso tanto del ácido sórbico como de sus sales de calcio, potasio y sodio. La baja solubilidad en agua del ácido, hace que se use su sal de potasio. A pesar de que la forma disociada (aniónica) del ácido sórbico presenta efecto antimicrobiano (Eklund, 1983), la concentración de la forma no disociada es la que tiene mayor actividad inhibitoria y ésta depende, por lo tanto, del pH. Por tener un pKa de 4,75 el ácido sórbico será muy eficaz en alimentos ácidos, siendo 6,0-6,5 el pH máximo en el que puede actuar eficazmente (Sofos y Busta, 1981).

Los productos de oxidación del ácido sórbico participan en reacciones de pardeamiento no enzimático. La oxidación del preservador ocurre por un mecanismo de radicales libres (Seow y Cheah, 1985; Vidyasagar y Arya, 1984).

**El ácido propiónico** y sus sales son primariamente usadas en alimentos horneados para suprimir la actividad de la

bacteria causante del "rope" en el centro del pan, el *Bacillus mesentericus*, y evitar el desarrollo de hongos en aquéllos y en productos de repostería. Propionatos de sodio y calcio son incorporados fácilmente durante la preparación de las masas en repostería, antes del horneado. También evitan el desarrollo de hongos en la superficie de los quesos. El Código Alimentario Argentino (CAA) establece el uso de los propionatos de calcio y sodio pero no el del ácido. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) permite el uso de ácido propiónico y de sus sales de sodio, potasio y calcio como preservativos.

La actividad antimicrobiana del ácido propiónico se manifiesta principalmente frente a hongos y, en menor grado, frente a bacterias. El ácido propiónico casi no tiene efecto contra levaduras. Su actividad es dependiente del pH, siendo recomendado su uso a pH menor a 5 y sólo ocasionalmente se lo extiende hasta pH 6. El ácido propiónico es prácticamente no tóxico a las concentraciones a las que se lo encuentra normalmente en los alimentos. Su pKa es aproximadamente 4,79. Se lo encuentra habitualmente como subproducto de la fermentación en la elaboración de quesos, especialmente en el Emmental, donde alcanza concentraciones de hasta el 1%.

Como existe la posibilidad de usar ácido sórbico o propiónico para evitar el desarrollo microbiano en alimentos de  $a_w$  0,94 y pH 3,5, se estudió la posible influencia de los mismos en el deterioro del AAs en condiciones de anaerobiosis y en el pardeamiento concomitante del sistema con glucosa (pH 3,5). De este modo se puede conocer la influencia de ellos en la calidad nutricional y organoléptica de los alimentos.

En la Tabla 28 puede observarse que no existe diferencia significativa entre las velocidades de destrucción del AAs, excepto a 80°C donde es significativamente mayor la velocidad de destrucción del AAs en el sistema con ácido propiónico. En cuanto a lo que respecta al PNE, no se manifiesta un patrón de comportamiento general, dado que a 70° y 80°C no hay diferencias significativas y a 90°C, es menor la velocidad de PNE con propiónico (Tabla 29).

**Tabla 28. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb).10 <sup>3</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,5 ± 0,4	25 ± 3
	80	6,6 ± 0,1 A	
	90	18,6 ± 0,7	
H (Propiónico)	70	3,0 ± 0,1	21 ± 3
	80	11,1 ± 0,1 A	
	90	17,6 ± 0,2	

**Tabla 29. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb).10 <sup>4</sup> (UAb/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	2,3 ± 0,2	34 ± 2
	80	10,2 ± 0,5	
	90	38,7 ± 0,4 A	
H (Propiónico)	70	2,4 ± 0,2	30 ± 4
	80	13,6 ± 1,1	
	90	28,8 ± 1,9 A	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura.

k y Ea con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

En el estudio, efectuado a 80°C y reportado en la Tabla 15, no se observó diferencia significativa en el PNE de ambos sistemas (A y H), ya sea con o sin agregado de AAs y para tiempos análogos de tratamiento. Esto significa que no existen diferencias en la influencia de ambos antimicrobianos ni en la caramelización de la glucosa a pH 3,5 ni en el pardeamiento resultante de la interacción AAs-glucosa.

Vemos entonces que el efecto del antimicrobiano elegido sobre la estabilidad del AAs y la estabilidad organoléptica depende de la temperatura considerada, en el rango 70°-90°C y, por lo tanto, no es claro.

#### 4.5.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)

Los resultados obtenidos para la destrucción del AAsT en los sistemas A, en el que el agente antimicrobiano es el ácido sórbico, y H, en el que el antimicrobiano es el ácido propiónico, ajustaron estadísticamente a diferentes órdenes de reacción (Tabla 30). A 70° y 80°C, el decaimiento registrado para el sistema A fue menor del 50%, lo que aumenta la incertidumbre en la determinación del orden de la reacción como ya fuera oportunamente destacado. Las constantes de velocidad de destrucción del AAsT en el sistema H mostraron un incremento con la temperatura (Tabla 30 y Fig. 82). En la Figura 82 no se nota un efecto claro de la temperatura en la concentración de DHA con el tiempo. Sólo cabría destacar al respecto, una mayor velocidad inicial de formación de DHA para el sistema H, conforme aumenta la temperatura, antes de las 50 horas de tratamiento térmico.

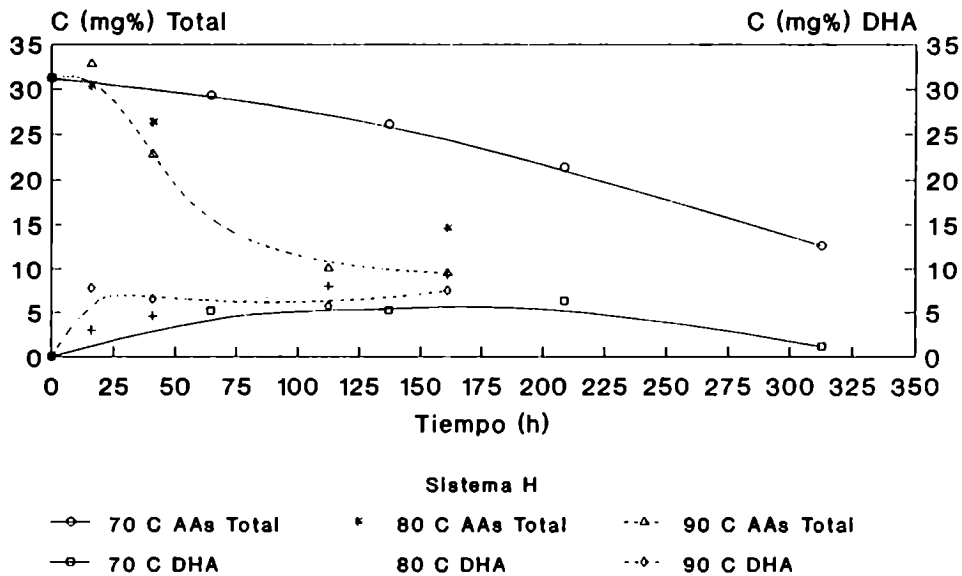


Fig. 82- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, en función del tiempo

Cuando se comparan gráficamente los sistemas A y H a cada temperatura (Figs. 83, 84 y 85), no se observan diferencias entre las velocidades de decaimiento del AAST a 70°; 80° o 90°C.

En cuanto al DHA, a 70° y a 90°C no se observa una influencia clara del antimicrobiano usado. A 80°C, pareciera ser levemente superior el DHA a cada tiempo en el sistema H cuando se lo compara con el sistema A. Es probablemente esta tendencia, la que determina que no haya diferencias en cuanto al AAST en ambos sistemas a 80°C, si bien el AAs mostraba una mayor velocidad de decaimiento en el sistema H, como ya se mencionó en el ítem correspondiente.

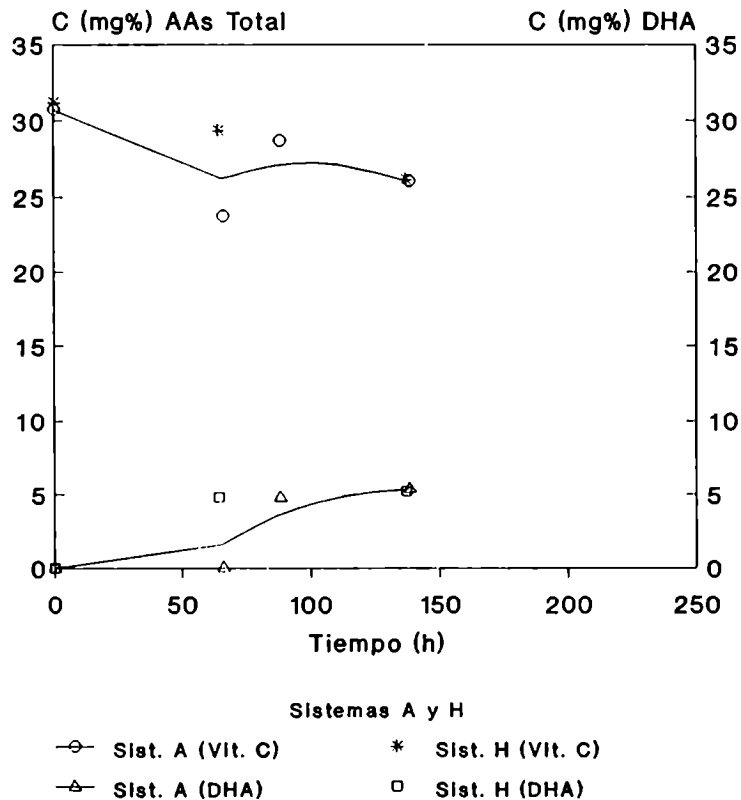


Fig. 83- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de aparición del DHA, a 70 C, en función del tiempo

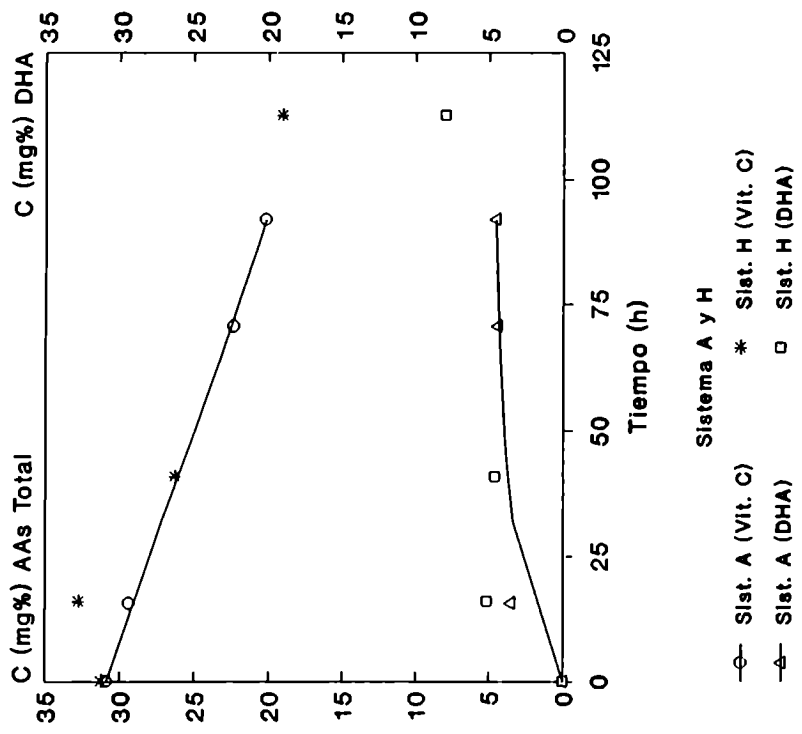


Fig. 84- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de aparición del DHA, a 80 C, en función del tiempo

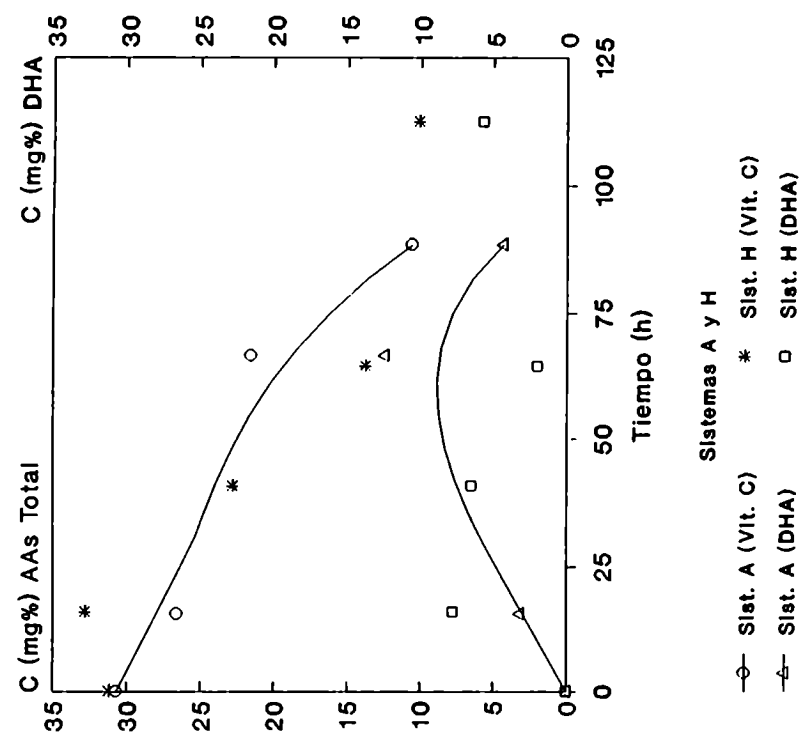


Fig. 85- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de aparición del DHA, a 90 C, en función del tiempo



Es conveniente destacar que el DHA remanente al final del lapso estudiado, alcanza concentraciones que superan aquéllas de las del AAs, a 80° y 90°C, en el sistema con ácido propiónico. Esto implicaría una menor velocidad de destrucción del DHA una vez formado, en el sistema H.

Podría entonces concluirse que, desde el punto de vista de la estabilidad de la vitamina C, no existiría una influencia significativa del antimicrobiano usado cuando se comparan los efectos de sorbatos y propionatos. El nulo efecto del antimicrobiano usado en el PNE, a 80°C, podría así, estar determinado por los efectos contrapuestos de aquéllos en la estabilidad del AAs y en la formación-destrucción del DHA.

**Tabla 30. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb).10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	70	NR	mg%/h	29,5 ± 18,6	-- --
	80	0	mg%/h	119,1 ± 12,2	
	90	0	mg%/h	197,7 ± 28,7	
H (Propiónico)	70	0	mg%/h	59,6 ± 5,6	--
	80	1	1/h	4,9 ± 0,3	
	90	1	1/h	8,8 ± 1,1	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

NR: no regresiona

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k con igual letra son significativamente diferentes (P:0,95).

#### 4.6. EFECTO DEL AGREGADO DE BISULFITO DE SODIO

##### 4.6.1. Acido ascórbico

En las Tablas 31 y 32 se indican las constantes de velocidad de destrucción del AAs y de desarrollo de PNE en

los sistemas A y J, entre 24° y 90°C. En este rango de temperatura, el aumento de la misma produce, en general, un incremento significativo (P: 0,95) de la velocidad de destrucción del AAs en el sistema J. En éste, el PNE sufre un aumento significativo (P: 0,95) de su velocidad en dicho rango, a excepción del correspondiente al incremento de 33° a 45°C; en consecuencia no pudo calcularse la energía de activación a las bajas temperaturas. En este rango se observa que, a 24° y 33°C, la presencia de bisulfito de sodio reduce significativamente la velocidad de destrucción del AAs, mientras que sólo a la menor temperatura citada, el aditivo reduce significativamente la velocidad de PNE respecto de la del sistema glucosado A. Debe destacarse que entre 24° y 45°C, en presencia de bisulfito de sodio (sistema J), o en su ausencia (sistema A), existe igual período de inducción del PNE, previo al desarrollo de absorbancia a 420 nm.

En el rango 70°- 90°C, la presencia de bisulfito de sodio no afecta significativamente la velocidad de destrucción del AAs. Sólo a 70°C se observa el efecto de este aditivo en el PNE, a través de una reducción de la velocidad de desarrollo de color y de la aparición de un período de inducción (lag) de 26 horas.

En las tablas precitadas se observan también las energías de activación resultantes. En el rango de 24°- 45°C, no existió diferencia significativa (P: 0,95) entre las energías de activación de los sistemas A y J, para la destrucción del AAs. Estas energías de activación resultaron ser menores que aquellas correspondientes al rango de 70°- 90°C, dentro de cada sistema. Tampoco existió diferencia significativa (P: 0,95) entre las energías de activación del PNE para los sistemas A y J entre 70° y 90°C.

**Tabla 31. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb).10 <sup>4</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	24	1,7 ± 0,1	10 ± 3 A
	33	2,6 ± 0,3	
	45	5,2 ± 0,6	
	70	24,6 ± 3,6	25 ± 3 A
	80	66,3 ± 1,1	
	90	185,5 ± 7,4	
J (Bisulfito)	24	1,0 ± 0,1	16 ± 3 B
	33	1,5 ± 0,1	
	45	5,3 ± 0,3	
	70	20,1 ± 1,1	28 ± 2 B
	80	70,1 ± 4,2	
	90	206,8 ± 10,6	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

Ea con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95):

Sistema A: 24°<33°<45°<70°<80°<90° Temp. 24°C: A>J (k)

Sistema J: 24°<33°<45°<70°<80°<90° Temp. 33°C: A>J (k)

Temp. 45°C: A=J (k)

Temp. 70°C: A=J (k)

Temp. 80°C: A=J (k)

Temp. 90°C: A=J (k)

Si se consideran las velocidades reportadas en las Tablas 31 y 32, podemos concluir que para un tiempo de almacenamiento a 24°C de 180 días, el sistema sin bisulfito (A) presenta una absorbancia de 0,025 y una concentración de AAs remanente de 17 mg%, mientras que en presencia de este aditivo la absorbancia es de 0,007 y la concentración de AAs remanente de 24 mg%. Ello muestra la ventaja del uso del mismo para sistemas a ser almacenados durante plazos largos a temperaturas de aproximadamente 24°C. Es de destacar que

una absorbancia de 0,01 ya se manifiesta como un leve color pardo en un sistema translúcido.

**Tabla 32. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Lag	(k ± sb) · 10 <sup>4</sup> (UAb/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	24	33 d	0,12 ± 0,01	-- --
	33	55 d	0,33 ± 0,08	
	45	20 d	0,35 ± 0,05	
	70		2,34 ± 0,17	34 ± 2
	80		10,19 ± 0,46	
	90		38,70 ± 0,37	
J (Bisulfito)	24	30 d	0,04 ± 0,01	-- --
	33	55 d	0,39 ± 0,17	
	45	20 d	0,31 ± 0,03	
	70	26 h	1,43 ± 0,15	38 ± 4
	80		9,57 ± 0,56	
	90		34,02 ± 4,36	

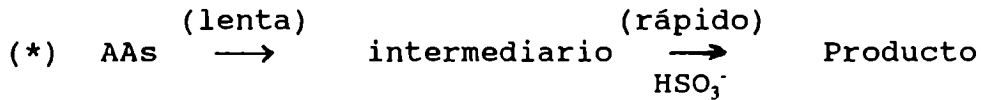
k: velocidad específica  
Ea: energía de activación  
sb: desviación estándar

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95):

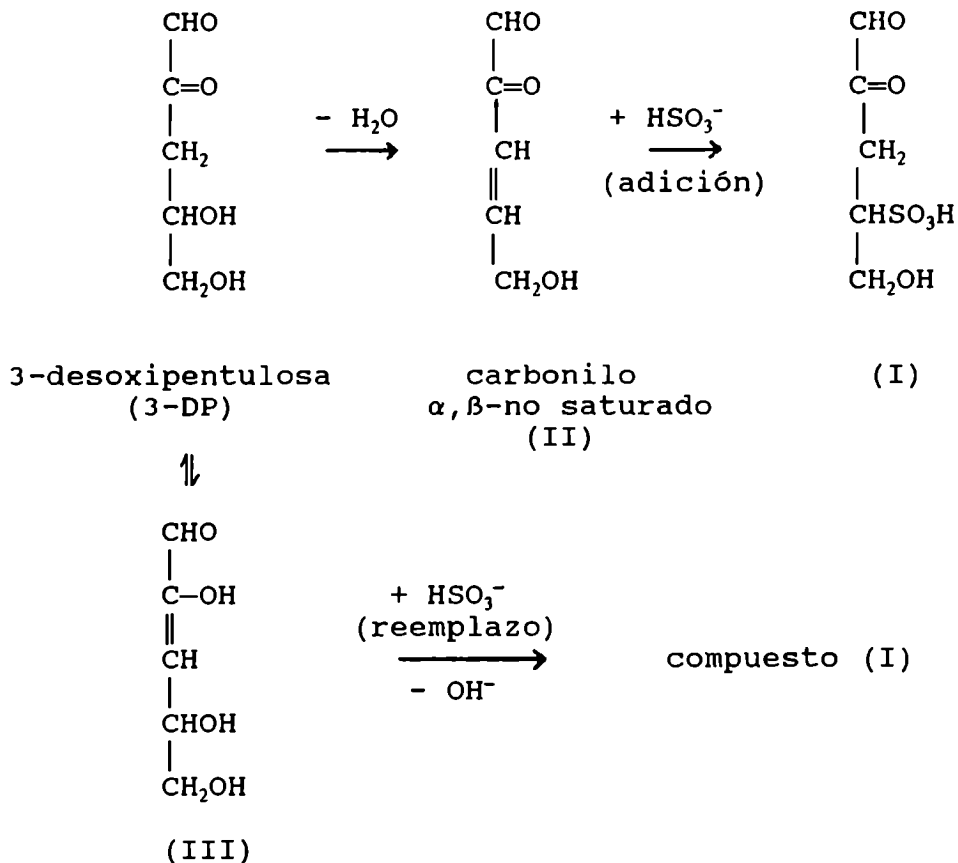
Sistema A: 24° < 33° = 45° < 70° < 80° < 90°      Temp. 24°C: A > J (k)  
Sistema J: 24° < 33° = 45° < 70° < 80° < 90°      Temp. 33°C: A = J (k)  
Temp. 45°C: A = J (k)  
Temp. 70°C: A > J (k)  
Temp. 80°C: A = J (k)  
Temp. 90°C: A = J (k)

Analizando la Tabla 15, se observa que el agregado de bisulfito de sodio al sistema con glucosa y pH 3,5, reduce a la mitad la velocidad del PNE producido por caramelización de la glucosa a 80°C. Por el contrario, el agregado de este aditivo, no tiene efecto sobre dicha velocidad en el sistema con glucosa en presencia de AAs, tal como ya fuera visto en la Tabla 32. Se puede concluir que el bisulfito de sodio es efectivo en inhibir el PNE producido por caramelización de la glucosa a aproximadamente 80°C.

Como ya fuera visto, la destrucción anaeróbica del AAs implica la formación del intermediario 3-desoxipentulosa (3-DP) (Kurata y Sakurai, 1967 a). La reacción del bisulfito con el AAs involucra una reacción lenta que da origen a un intermediario, el cual reacciona con el bisulfito, según el siguiente esquema:

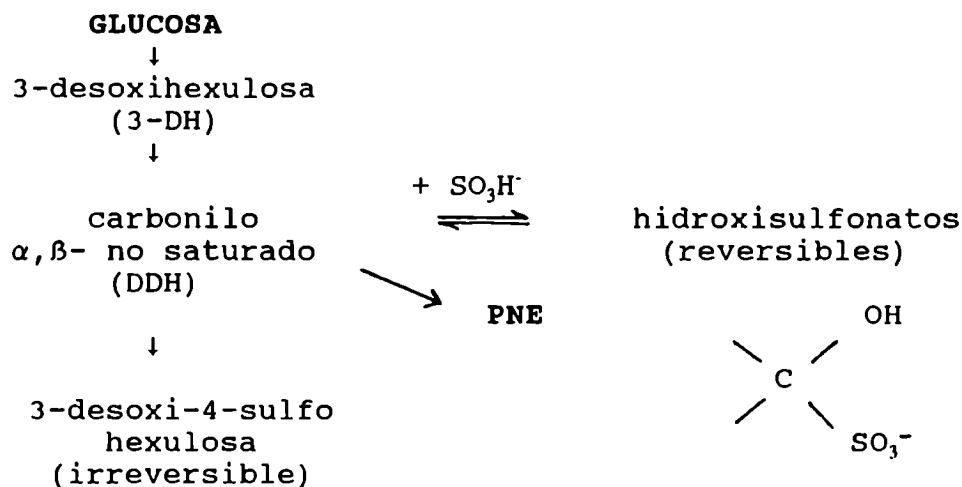


donde el "Producto" es 3,4-didesoxi-4-sulfopentulosa (I), sulfonato orgánico el cual es un compuesto irreversible del bisulfito. Las únicas reacciones posibles para la formación de intermediarios que dan lugar a sulfonatos orgánicos serían las de descarboxilación y deshidratación del AAs, las que serían seguidas por la adición del oxanión S (IV) (por ejemplo, bisulfito) a la 3,4-didesoxi-3-ene-pentulosa (DDP) (II) o por el reemplazo del hidroxilo en C<sub>4</sub> del compuesto análogo (III) (Wedzicha y Mc Weeny, 1974):

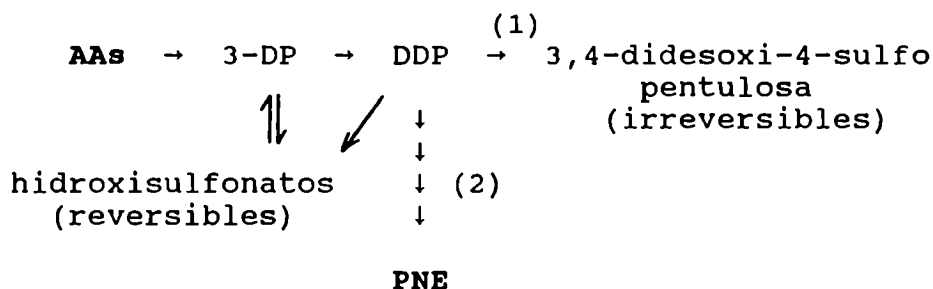


En la reacción de Maillard las reacciones son análogas, pero es de destacar que la presencia del aminoácido provoca que la producción de 3-desoxi sulosas a partir de azúcares (3-desoxi hexulosa, en el caso en que el azúcar sea D-glucosa) ocurra a temperaturas muy por debajo de aquéllas a las cuales dichos compuestos son formados en ausencia de aminoácidos, por degradación térmica (caramelización). Las desoxi-sulosas son importantes intermediarios del pardeamiento. A pHs bajos, llevan a la posterior formación de hidroximetil furfural (HMF) o furfural, los que pardean por condensación consigo mismos o con el aminoácido, en el caso en que éste se encuentre presente. En términos de producción de color, la reactividad de los compuestos del tipo carbonilo  $\alpha,\beta$ -no saturado es alta cuando se la compara con sus análogos saturados o con el furfural o HMF. La efectividad del bisulfito en retardar el pardeamiento de dichos compuestos carbonílicos no saturados, se considera que es debida a la formación de hidroxisulfonatos reversibles. Estos productos son poco reactivos en la producción de color (Wedzicha y Mc Weeny, 1974).

La diferencia fundamental entre el pardeamiento, inhibido por bisulfito, del AAs y el de la mezcla glucosa-glicina es que, mientras la presencia de glicina es esencial para que ocurra la pérdida irreversible del bisulfito en la reacción de Maillard, la presencia del aminoácido (aa.) tiene sólo un pequeño efecto sobre la velocidad de combinación del aditivo con los productos de degradación del AAs, aunque la glicina acelera la velocidad de pardeamiento del AAs en ausencia del aditivo. Este resultado es concordante con las características de los estados iniciales de ambos tipos de reacciones de pardeamiento. La formación del reactivo intermediario a partir del AAs es un proceso espontáneo (Wedzicha, 1984).



La destrucción anaeróbica del AAs en presencia de bisulfito de sodio procederá entonces de la siguiente forma:



La energía de activación de la vía (1) es de 17 Kcal/mol y la de (2) de 35 Kcal/mol (Wedzicha, 1984). A las bajas temperaturas, probablemente el bisulfito inhiba efectivamente la degradación del AAs pues llegue a formarse el derivado 3,4-dideoxisulfopentosulosa, además de los hidroxisulfonatos reversibles.

A las mayores temperaturas, en cambio, cobraría mayor importancia la vía de PNE del AAs por su mayor energía de activación; ello determinaría que el bisulfito no ejerza efecto significativo sobre la destrucción del AAs. La formación de hidroxisulfonatos reversibles no pareciera ser significativa pues no se refleja en un efecto inhibitor de la destrucción del AAs, ejercido por el bisulfito a las altas temperaturas.

El análisis del fenómeno de PNE del sistema estudiado debe tener en cuenta, además, que en el sistema J no están ocurriendo únicamente las reacciones de PNE a partir del AAs, sino también a partir de la glucosa. A su vez, estos reactivos actúan sinérgicamente para producir pardeamiento (reacción de Michael) y, según se observa en la Tabla 15, el bisulfito no es capaz de inhibir el desarrollo de color resultante de dicha interacción a 80°C, dado que no existe diferencia significativa entre los sistemas A y J, con AAs agregado. El bisulfito puede reducir la velocidad de PNE de la glucosa, a 80°C, como se observa en la Tabla 15 a través de la formación de hidroxisulfonatos reversibles. Sin embargo, cuando a la misma temperatura se encuentran presentes el AAs y la glucosa, el bisulfito no presenta efecto significativo sobre el PNE; como ya comentamos, hay un sinergismo (reacción de Michael) ejercido por la presencia conjunta de AAs y glucosa, sobre el pardeamiento. Probablemente sea este efecto el que determinó que únicamente a 24°C se observe una disminución del PNE en presencia del aditivo (Tabla 32).

Debemos destacar que a 70°C se presentó una anomalía en cuanto a que, si bien el uso de bisulfito no disminuyó la velocidad de destrucción del AAs respecto de la del sistema A, hubo sin embargo una disminución significativa de la velocidad de PNE respecto de aquel sistema sin bisulfito a **igual temperatura**, así como la aparición de un período de inducción.

#### **4.6.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)**

Analizando los resultados presentados en la Tabla 33, en el sistema conteniendo bisulfito (J) se observa que la cinética de destrucción del AAsT ajusta a orden cero para todas las temperaturas estudiadas, excepto a 45°C, donde presenta orden uno, y a 24°C, donde el orden no es ni cero ni uno. Esto dificulta la comparación estadística de las constantes de velocidad con las del sistema A.



Se puede decir que el sistema modelo con bisulfito presenta diferencias en sus constantes de velocidad con la temperatura. Ello se comprobó para las temperaturas con orden cero (33°; 70°; 80°; 90°C) a un nivel de probabilidad de 0,95 (Tabla 33) y para la totalidad de ellas mediante los gráficos de las figuras 86 y 87. La dependencia de las constantes de velocidad con la temperatura no fue de tipo Arrhenius, entre 70° y 90°C.

**Tabla 33. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb) .10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc./3,5)	24	0	mg%/h	3,46 ± 0,59	--
	33	1	l/h	0,14 ± 0,03	
	45	1	l/h	0,35 ± 0,02	
	70	NR	mg%/h	29,45 ± 18,61	
	80	0	mg%/h	119,05 ± 12,20	
	90	0	mg%/h	197,72 ± 28,74	
J (Bisulfito)	24	NR	mg%/h	1,14 ± 0,45	
	33	0	mg%/h	2,55 ± 0,31	
	45	1	l/h	0,31 ± 0,03	
	70	0	mg%/h	43,34 ± 4,56	
	80	0	mg%/h	120,75 ± 7,85	
	90	0	mg%/h	178,17 ± 17,79	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

NR: no regresiona

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura según:

\* Relación entre las constantes de velocidad (k):

Sistema A: 33°<45°      80°<90°

Sistema J: 33°<70°<80°<90°

Temp. 45°C: A=J

Temp. 80°C: A=J

Temp. 90°C: A=J

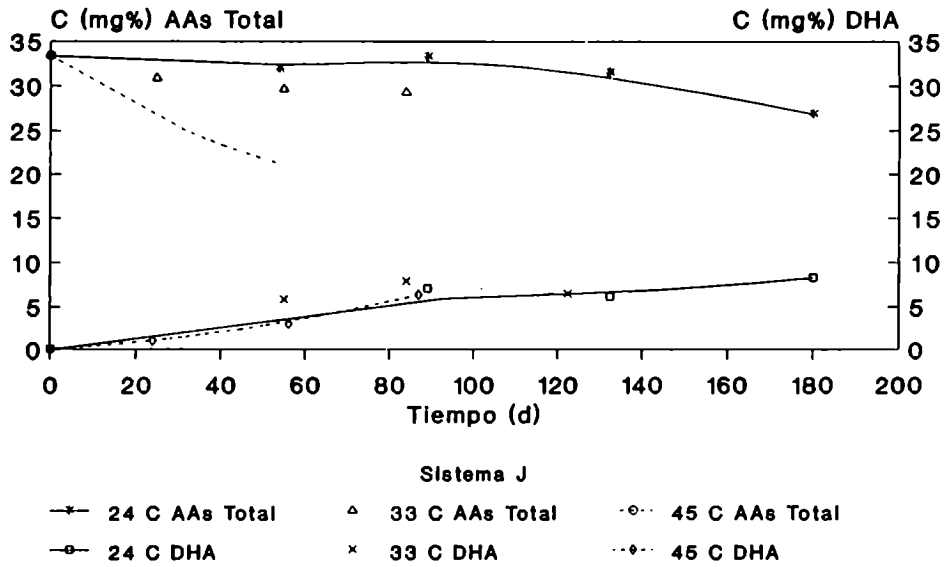


Fig. 86- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, en función del tiempo

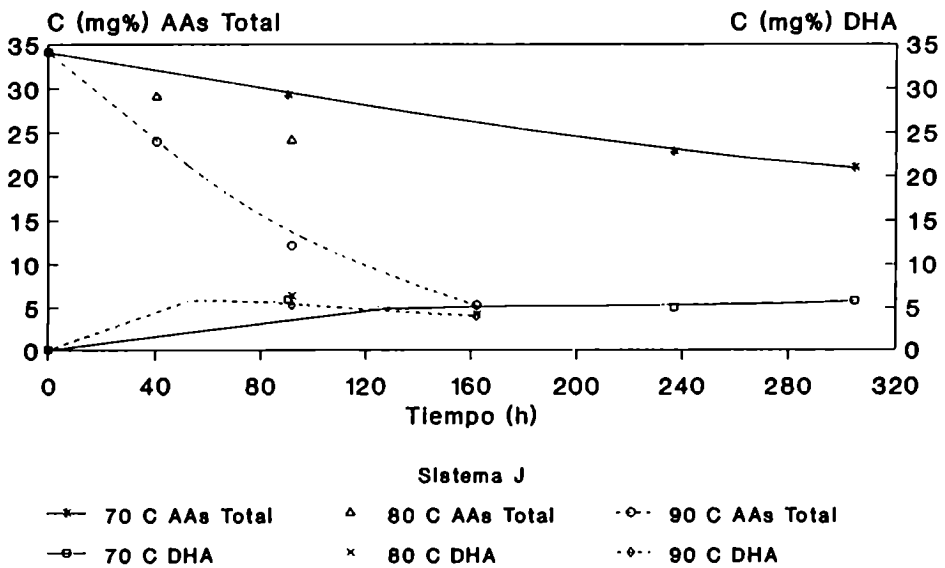


Fig. 87- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación de DHA, en función del tiempo

En los gráficos de las figuras 88 a 93 se puede observar la evolución del AAsT y del DHA en los sistemas A y J para las distintas temperaturas. Se puede ver que la presencia de bisulfito no ejerce un efecto claro sobre el perfil de formación y de desaparición simultánea del DHA. Sólo se destaca un pico de DHA de aproximadamente 12 mg% a 90°C para el sistema A, después de 65 horas de tratamiento, el que no aparece en presencia de bisulfito. En cuanto al AAsT, a 24° y 33°C, la presencia de bisulfito determinaría una mayor retención a cada tiempo según se observa en las Figs. 88 y 89. A 45°, 80° y 90°C, el bisulfito no afecta la destrucción del AAsT ya que no existe diferencia significativa ( $P: 0,95$ ) entre dichas velocidades de destrucción (Tabla 33) respecto de las del sistema A, a las mismas temperaturas. Tampoco se vería diferencia entre dichos sistemas a 70°C (Fig. 91).

Evidentemente, la tendencia observada es la misma ya reportada para el AAs: el efecto diferencial del bisulfito a las altas y bajas temperaturas se debería a las distintas energías de activación de la reacción de PNE y de la reacción de formación de los compuestos sulfonados, como fuera explicado en párrafos previos.

El DHA se pardea per se más fácilmente que el AAs. El camino para ello involucra la apertura del anillo lactónico para dar 2,3-DCG seguido de su degradación. Este último sufre rápida descarboxilación para dar L-xilosona.

El efecto de los oxaniones de S (IV) sobre el pardeamiento oxidativo del AAsT es doble. Primero, el aditivo inhibe la autooxidación del AAs y secundariamente previene el pardeamiento del DHA. El mecanismo del efecto sobre la autooxidación no es bien conocido pero podría involucrar interacciones con radicales libres intermediarios. Según Wedzicha (1984) la reacción de adición del bisulfito al AAs sufriendo oxidación, es máxima a pH 9,5 y no está bien estudiada a los pHs de los alimentos. Si se forma DHA, los oxaniones de S (IV) reducirían su reactividad por formación de monohidroxisulfonatos (reversibles) de constante de formación  $1750 M^{-1}$  a pH 4 y 20°C, según lo reportado por el

precitado autor. No existe evidencia de la formación de compuestos irreversibles entre DHA y el bisulfito. Evidentemente, en nuestro caso, la escasa cantidad de oxígeno presente junto con la reversibilidad de los compuestos DHA-bisulfito, determinan la nula influencia de este preservador en el DHA dosado. En consecuencia, el efecto protector que muestra el bisulfito sobre el AAST a 24° y 33°C, sería una consecuencia del efecto del aditivo sobre el AAs.

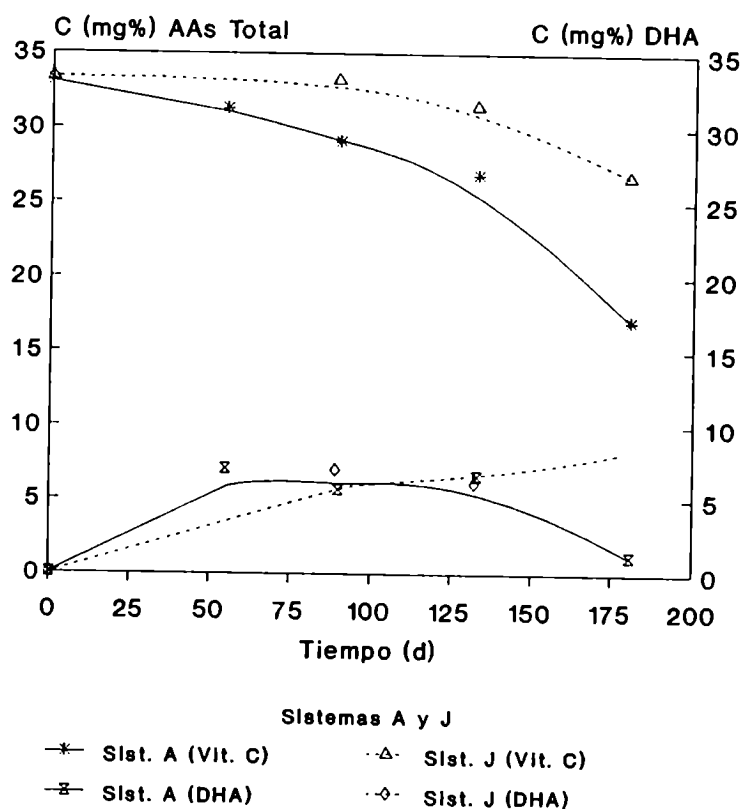


Fig. 88- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 24 C, en función del tiempo

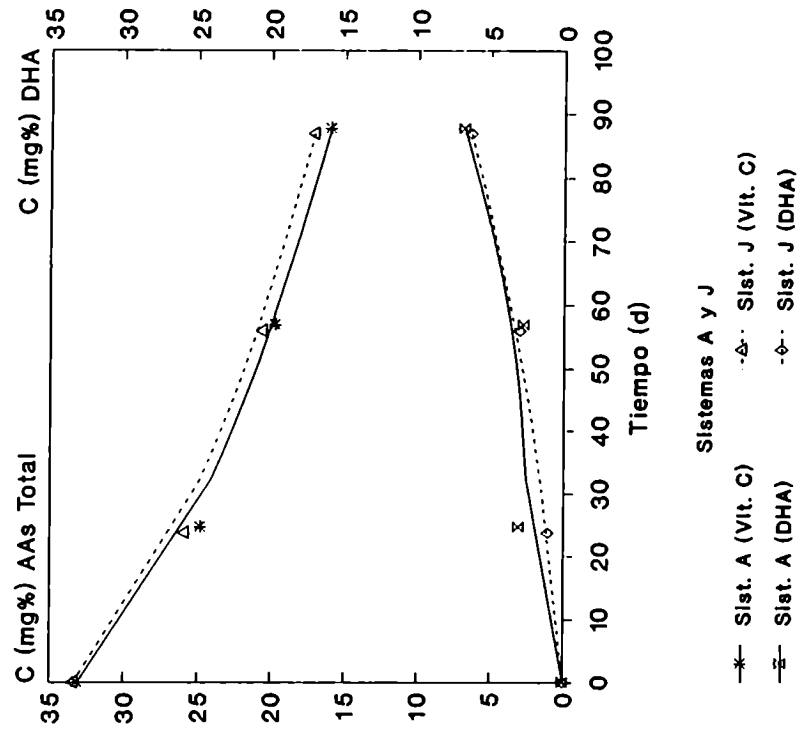


Fig. 90- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de destrucción del DHA, a 45 C, en función del tiempo

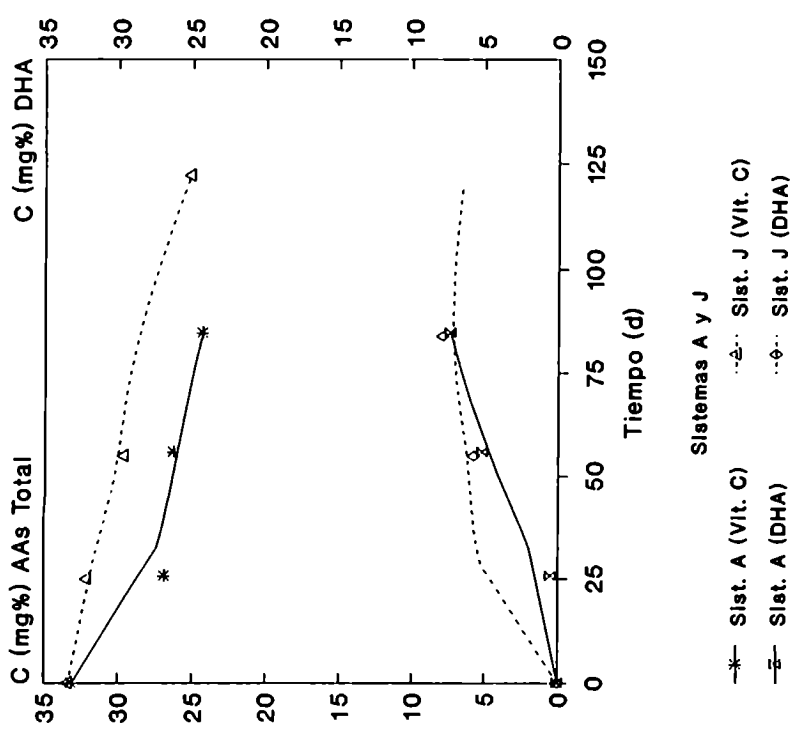


Fig. 89- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de aparición del DHA, a 33 C, en función del tiempo

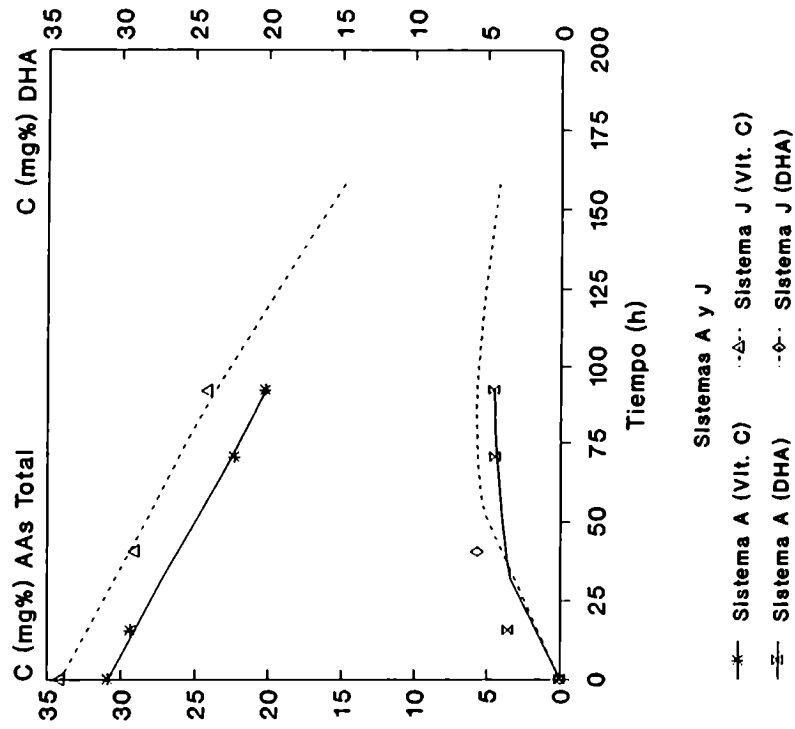


Fig. 92- Perfiles de destrucción del AAAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 80 C, en función del tiempo

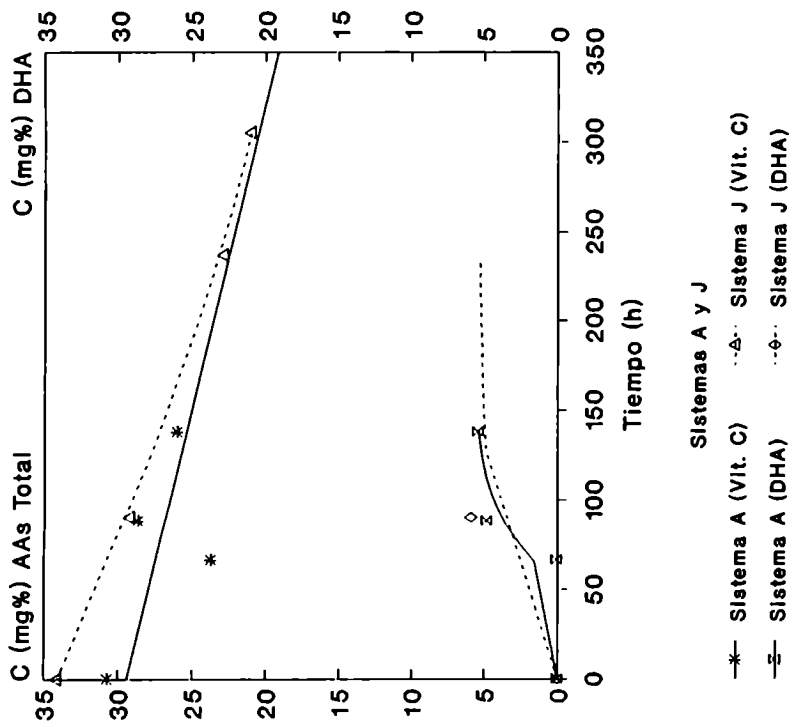
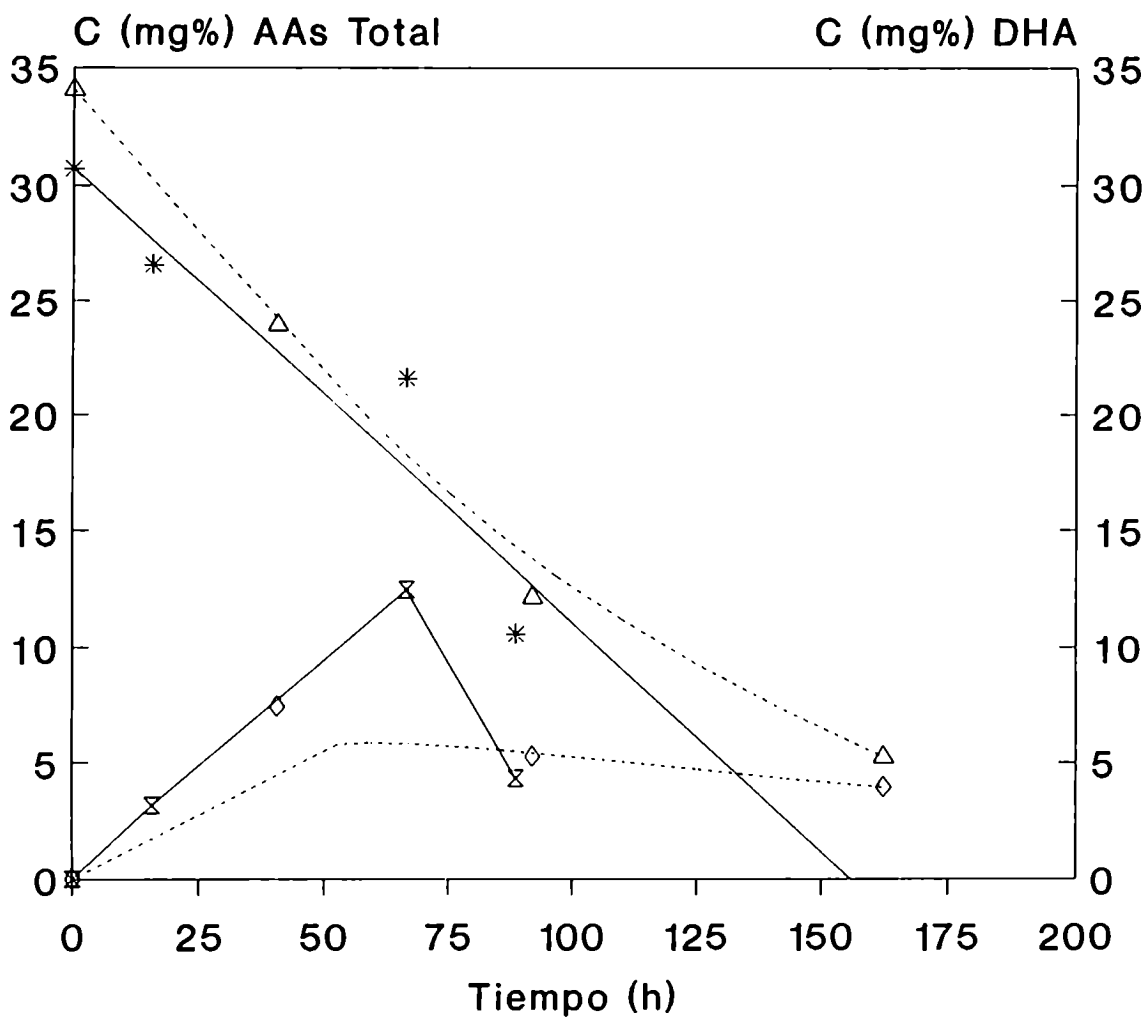


Fig. 91- Perfiles de destrucción del AAAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 70 C, en función del tiempo



Sistemas A y J

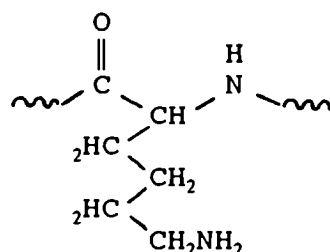
- \*— Sistema A (Vit. C)
- △— Sistema J (Vit. C)
- x— Sistema A (DHA)
- ◇— Sistema J (DHA)

Fig. 93- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 90 C, en función del tiempo

#### 4.7. EFECTO DE LA PRESENCIA DE UN AMINOACIDO (L-LISINA)

##### 4.7.1. Acido ascórbico

El aminoácido esencial L-lisina es especialmente activo en la reacción de Maillard, comparado con otros aminoácidos. Esto se debe a que tiene un grupo amino extra ( $\epsilon$ -amino) en la cadena carbonada, el que resulta asequible cuando el grupo  $\alpha$ -amino está comprometido en la unión peptídica:



**Residuo de L-lisina**

Esta reacción restringe entonces la disponibilidad dietaria de este aminoácido, determinando la pérdida del valor nutritivo del alimento que lo contiene por pérdida del valor biológico de las proteínas que lo cuentan en su molécula. Esto debe ser tenido muy en cuenta, especialmente en alimentos de origen vegetal, los que ya de por sí son pobres en lisina y cuyas proteínas son de bajo valor biológico. Es entonces fundamental el conocimiento de la composición de los alimentos y de las interacciones posibles entre los distintos constituyentes para poder evaluar y controlar las transformaciones químicas que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. El estudio de la reacción de Maillard no sólo es importante en la ciencia de los alimentos sino también en bioquímica y en medicina, campos en los que aquélla ha cobrado particular interés. Allí se desean explorar las relaciones entre la patología de la diabetes y otras enfermedades, y la glicosidación in vivo y consecuente "pardeamiento" de la





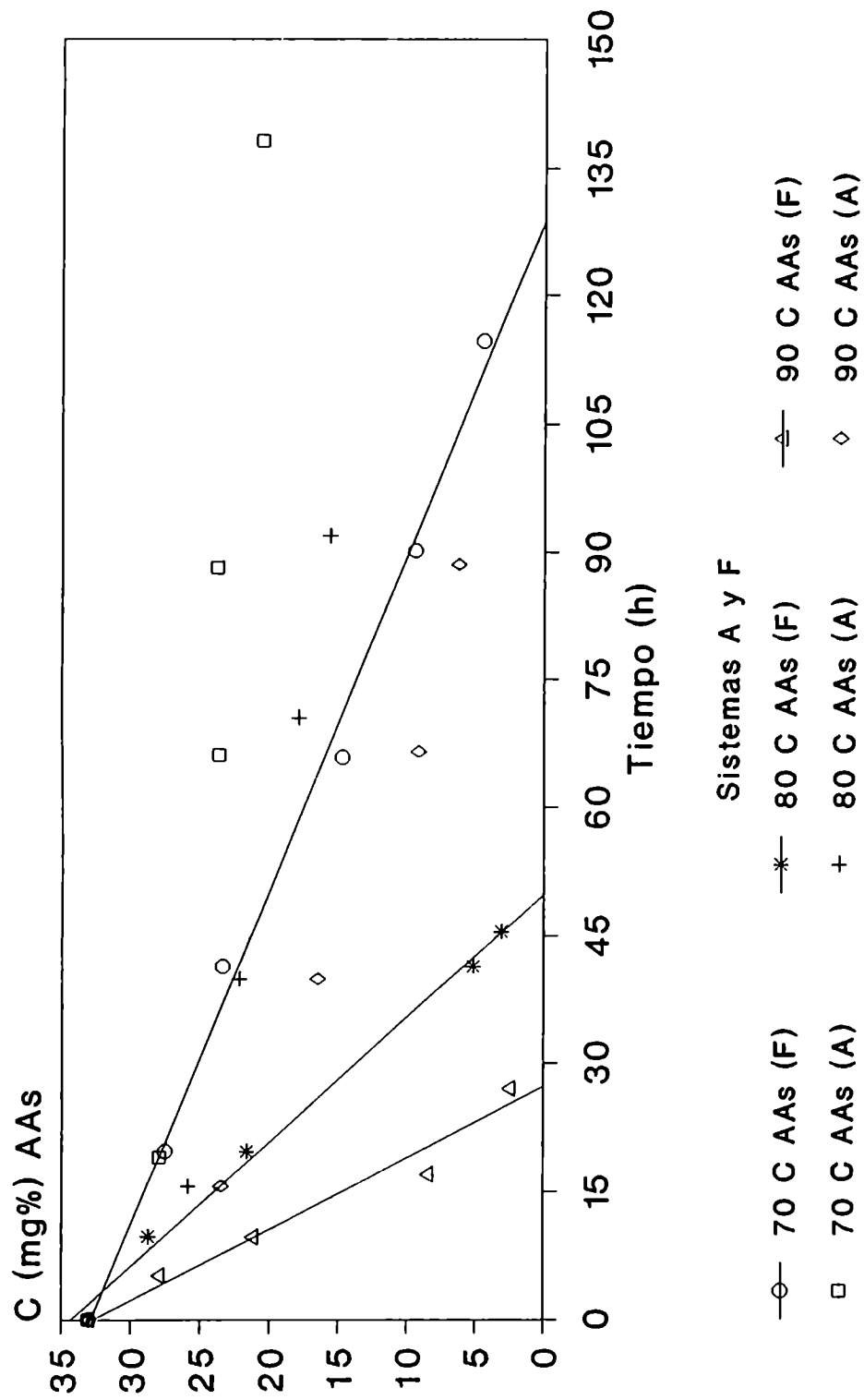


Fig. 94- Perfiles de destrucción del AAs en función del tiempo de tratamiento

**Tabla 34. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb)10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	70	1	1/h	2,5 ± 0,4	25 ± 3
	80	1	1/h	6,6 ± 0,1	
	90	1	1/h	18,6 ± 0,7	
F (L-lisina)	70	0	mg%/h	252,9 ± 15,3	
	80	0	mg%/h	731,8 ± 17,4	
	90	0	mg%/h	1185,9 ± 198,0	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura.

En cuanto al PNE de los sistemas aquí analizados, podemos ver en la Tabla 35 un notable aumento de la constante de velocidad en presencia del aminoácido (sistema F). Según Kurata y Sakurai (1967), la velocidad de desarrollo de color en soluciones de AAs es incrementada en la presencia de aminocompuestos.

**Tabla 35. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb)10 <sup>4</sup> (UAb/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	70	2,3 ± 0,2 A	34 ± 2
	80	10,2 ± 0,5 B	
	90	38,7 ± 0,4 C	
F (L-lisina)	70	206,9 ± 29,4 A	
	80	227,0 ± 6,5 B	
	90	636,2 ± 135,1 C	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura, excepto para el sistema F entre 70° y 80°C. k y Ea con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

Las constantes de velocidad para la destrucción del AAs no presentan una dependencia de tipo Arrhenius con la temperatura, en presencia de L-lisina (sistema F) (Tabla 34). Para el PNE en este sistema no se pudo calcular una energía de activación porque no hay diferencia significativa entre las velocidades de pardeamiento a 70° y a 80°C (Tabla 35).

Analizando los resultados que se indican en la Tabla 15 para el sistema modelo F, se observa que no existió diferencia significativa entre las velocidades de PNE a 80°C del sistema conteniendo lisina, estuviese o no el AAs presente en el medio de reacción. Esto significaría que habiendo en el medio glucosa y L-lisina presentes en las concentraciones indicadas en la Tabla 8, la destrucción anaeróbica del AAs **no es determinante del oscurecimiento en tales condiciones**. El efecto del AAs, a 80°C, en el desarrollo de color quedaría enmascarado por otros mecanismos como la reacción de Maillard en especial.

Buera y col. (1987) observaron que la contribución relativa de la caramelización al pardeamiento total en presencia de glicina depende del pH y del azúcar en cuestión. Para todos los azúcares, esta contribución es más importante a pH 4,0 que a pHs mayores. En el caso del sistema glucosa-glicina, la caramelización resulta despreciable como contribuyente significativo al pardeamiento total. Curl (1949) observó que el jugo de naranja almacenado en ausencia de oxígeno, mostraba a la reacción de azúcares con aminoácidos como la principal causa del oscurecimiento. Estos resultados son concordantes con los nuestros. Sin embargo, el precitado investigador determinó que la adición de AAs a esta combinación incrementaba el pardeamiento. Probablemente en este caso, se pudo distinguir la influencia del AAs, porque se usaron concentraciones de aminoácidos y de azúcares menores a las utilizadas en el presente trabajo. Wong y Stanton (1989) obtuvieron resultados distintos a los nuestros al establecer que el principal causante del PNE en jugo concentrado de kiwi era la destrucción del AAs.

Reafirmando la gran influencia de la L-lisina en el PNE, en la Tabla 16 se ve cómo, a igual concentración residual de AAs (por ejemplo, 20 mg%), la presencia de L-lisina determina una absorbancia a 420 nm de 0,9070 a 90°C, luego de 10 horas de tratamiento térmico, mientras que en el sistema A, luego de 26 horas de tratamiento a dicha temperatura, la absorbancia es de sólo 0,1008.

Míkova y col. (1979) encontraron que el ácido glutámico resultó ser un verdadero inhibidor del oscurecimiento, en el curso de un estudio de destrucción del AAs a 20°C en presencia de dicho aminoácido y de oxígeno. Estos investigadores encontraron que dicho aminoácido estabilizaba al AAs tanto a pH 3,5 como a pH 4,6. También hallaron que durante la acción combinada de ácido glutámico y cobre (II), el aminoácido reducía significativamente el efecto catalítico de los iones cobre. La velocidad de destrucción del AAs disminuía al aumentar la concentración de ácido glutámico.

A pesar de que en el sistema modelo F, la contribución del AAs al pardeamiento se ve enmascarada, fundamentalmente, por la reacción de Maillard de los azúcares, la vitamina se destruye muy rápidamente y con otro orden de reacción diferente al del resto de los sistemas (Tabla 34 y Fig. 94). Debe tenerse en cuenta que aquí, la presencia del aminoácido junto con el AAs haría que se sumara a las reacciones de Maillard y caramelización, la degradación de Strecker. Esta reacción ocurre, como ya fuera oportunamente indicado, entre compuestos dicarbonílicos originados por destrucción aeróbica o anaeróbica del AAs (DHA, 3-desoxipentulosa) y el grupo amino del aminoácido. Por esta vía se genera ácido escorbámico o un derivado de él y, posteriormente, pigmentos marrones o pardos cuando se está en medio ácido. El AAs puede dar lugar entonces a la formación de estos pigmentos por su participación en la reacción de Maillard y/o en la degradación de Strecker, como se observa en la Figura 95. Lalikainen y col. (1958), determinaron que la degradación de Strecker no ocurriría en grado detectable en el pardeamiento del jugo de naranja a pH 3,7 y 7,0, bajo nitrógeno y bajo

oxígeno a temperaturas de 37° y 50°C. A su vez, fue marcadamente diferente la relación entre la producción de dióxido de carbono y la de pigmentos, según la temperatura de trabajo. Así, a 37°C, dicha relación fue lineal y a 50°C, no. Esto mostraría un posible cambio en el mecanismo de destrucción del AAs entre 37° y 50°C, postulado previamente por Joslyn (1956). Probablemente, a 50°C, se activaría una segunda reacción productora de pigmentos del "browning". Debe tenerse en cuenta que el efecto producido por los distintos aminoácidos es diverso. Así, cuando Hayashi y col. (1983) estudiaron la reacción de diversos aminoácidos con el DHA a pH 7,0, observaron que el triptofano, la metionina, la valina y la fenilalanina fueron los aminoácidos más reactivos en la producción de pardeamiento, mientras que la glicina resultó ser de los menos reactivos.

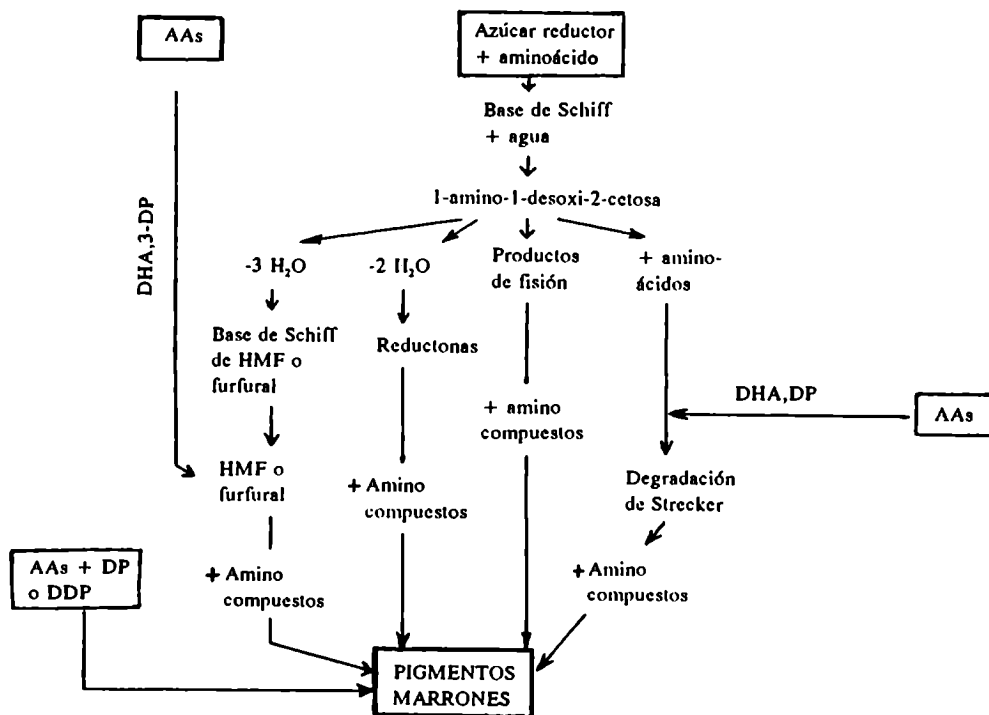


Fig. 95. Esquema de las reacciones de pardeamiento no enzimático que involucran grupos amino (Hodge, 1953; Wedzicha, 1984; Davies y Wedzicha, 1994).

En la figura 95 se reportan los hallazgos de Davies y Wedzicha (1994) referente a las melanoidinas formadas en presencia del AAs y del aminoácido glicina. Bajo condiciones anaeróbicas, el AAs sufre descarboxilación y deshidratación espontáneas para formar 3-desoxipentulosa (DP) y furfural, a través del compuesto intermediario carbonílico  $\alpha,\beta$ -no saturado, 3,4-didesoxi-3-ene-pentulosa (DDP) (Kurata y Sakurai, 1967). Ambos compuestos, DP y DDP, son análogos a la 3-desoxihexulosa (DH) y 3,4-didesoxi-3-ene hexulosa (DDH) formada por la reacción de Maillard a partir de hexosas (Davies y Wedzicha, 1994). Las melanoidinas resultantes de la reacción de un azúcar con glicina tienen diferente composición que aquellas resultantes del pardeamiento por AAs-glicina. Davies y Wedzicha (1994) sugieren la posibilidad de incorporación del AAs sin descarboxilar en las macromoléculas de melanoidinas, ya sea como resultado de una reacción directa con glicina o por adición al polímero en crecimiento, el cual puede involucrar residuos DP. Posibles reacciones que pueden ocurrir para que se dé la incorporación de AAs no descarboxilado en las melanoidinas, incluyen la formación de un acetal entre el enediol y un compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico, o bien la adición de Michael entre el anión del AAs y un compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -no saturado (Fodor y col., 1983). Davies y Wedzicha (1994) postularon que el AAs reaccionaría con DP o DDP (1:1) para formar un intermediario. Una molécula de este producto podría también adicionarse a la subunidad de melanoidina formada a partir de DP y glicina (1:1) o verse involucrada en una reacción de polimerización con una molécula de DP y glicina entrando así por otra vía en el ciclo de PNE.

Como resultado de lo visto, existiría entonces una mezcla compleja de pigmentos de diferentes orígenes que haría que la absorptividad específica resultante del sistema a 420 nm respondiera a una constitución diferente a la del resto de los medios estudiados.

La destrucción del AAs en el presente sistema no contribuye en grado significativo al deterioro organoléptico

cuando se lo compara con la contribución de la glucosa, probablemente por su baja concentración respecto al azúcar. Sin embargo, esto no significa que el AAs no participe activamente en las reacciones que ocurren en el sistema F, lo que se pone en evidencia por la considerablemente mayor velocidad de destrucción del AAs en este sistema modelo respecto de la que presenta en el sistema A (Tabla 34 y Fig. 95) así como por el orden de reacción cero, en presencia de lisina, el cual mostraría la influencia de las reacciones de pardeamiento en la destrucción del AAs cuando hay aminoácidos.

#### **4.7.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)**

En la Tabla 36 se pueden observar las constantes de velocidad de destrucción de la vitamina C en el sistema F, conteniendo L-lisina. El aumento de la temperatura, determina un aumento significativo ( $P: 0,95$ ) en la velocidad de degradación de aquélla. Sin embargo, la dependencia de dichas constantes con la temperatura no muestra una relación de tipo Arrhenius. En presencia de L-lisina, la formación inicial de DHA muestra una tendencia al aumento conforme se eleva la temperatura, a tiempos de tratamiento menores de 17 horas. Para lapsos mayores, se observa un brusco descenso a  $90^{\circ}\text{C}$  (Fig. 96).

Existen diferencias significativas entre las velocidades de destrucción del AAsT, a  $80^{\circ}\text{C}$  y a  $90^{\circ}\text{C}$ , entre los sistemas A y F, observándose un aumento significativo en la destrucción de la vitamina en presencia del aminoácido (Tabla 36). A  $70^{\circ}\text{C}$ , se observa en la Fig. 97 esa misma tendencia.

En cuanto al DHA, para tiempos de tratamiento menores de 17 horas, solamente a  $90^{\circ}\text{C}$  se observa una influencia notable del aminoácido (Figs. 97 a 99), incrementándose la cantidad de DHA presente a cada tiempo, en presencia de L-lisina. Sin embargo, este período de formación del DHA es seguido por un brusco decaimiento del mismo. Probablemente,



esta tendencia sea el resultado de la influencia del aminoácido en los caminos de formación y de destrucción simultánea del DHA. En el sistema A, la máxima formación de DHA ocurre más tardíamente. Debe destacarse que, hacia el final del lapso estudiado, la concentración de DHA remanente supera aquella correspondiente al AAs.

**Tabla 36. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb)10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	70	NR	mg%/h	29,5 ± 18,6	-- --
	80	0	mg%/h	119,1 ± 12,2 A	
	90	0	mg%/h	197,7 ± 28,7 B	
F (L-lisina)	70	0	mg%/h	219,4 ± 17,7	
	80	0	mg%/h	434,8 ± 117,7A	
	90	0	mg%/h	1079,9 ± 77,6 B	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

NR: no regresiona

k de un dado sistema varía significativamente (P: 0,95) con la temperatura

k con igual letra son significativamente diferentes (P: 0,95).

Wedzicha (1984) reportó la formación de un color rojo o cereza cuando el DHA y un aminoácido se mezclaban, sugiriendo que la primera etapa correspondía a la reacción de Strecker entre el DHA y el  $\alpha$ -aminoácido, seguido de la oxidación del producto a una imina. El producto sería lábil y conduciría, finalmente a la producción de pigmentos marrones cuando la reacción ocurre en medio ácido.

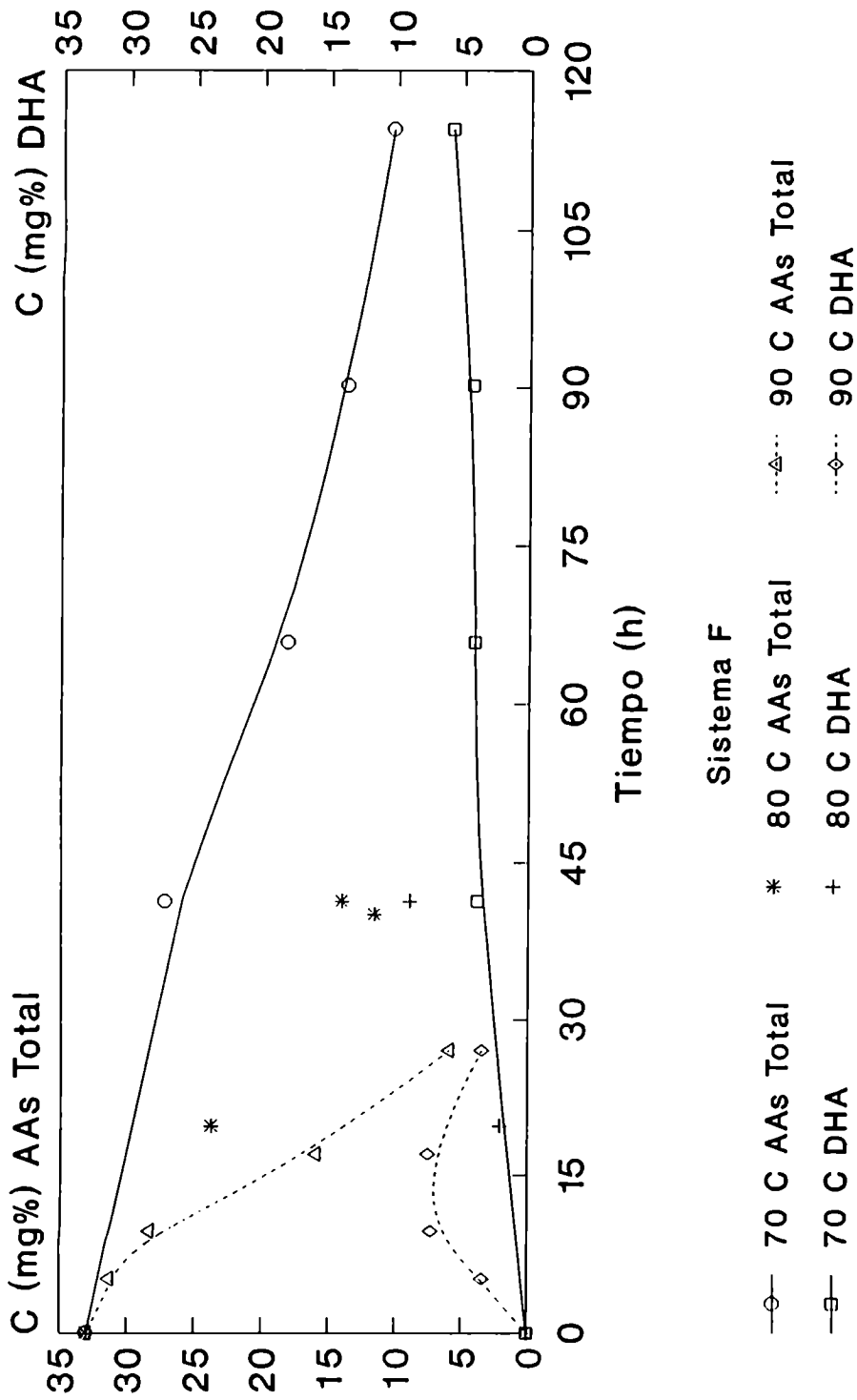


Fig. 96- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, en función del tiempo

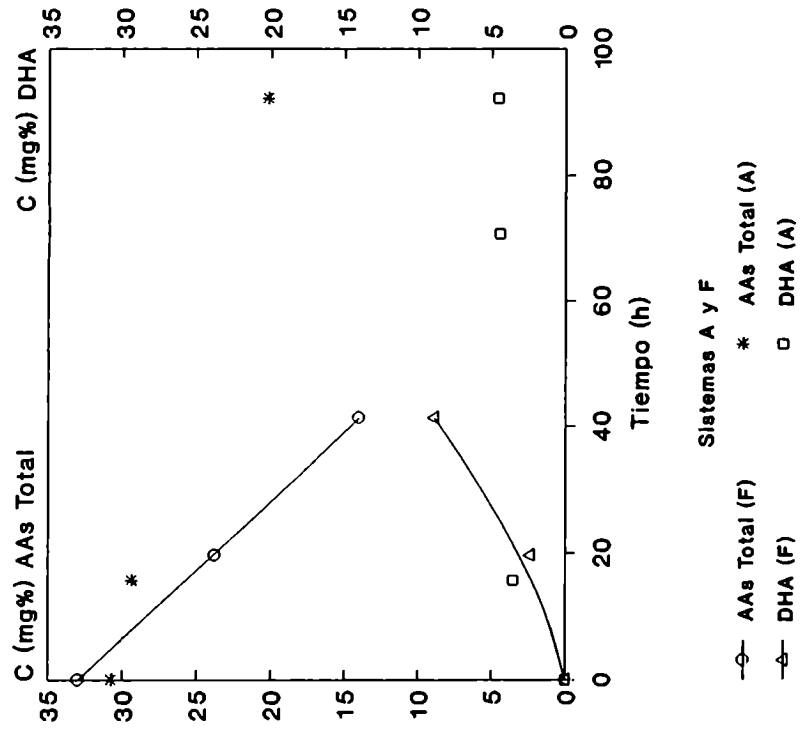


Fig. 98- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 80 C, en función del tiempo

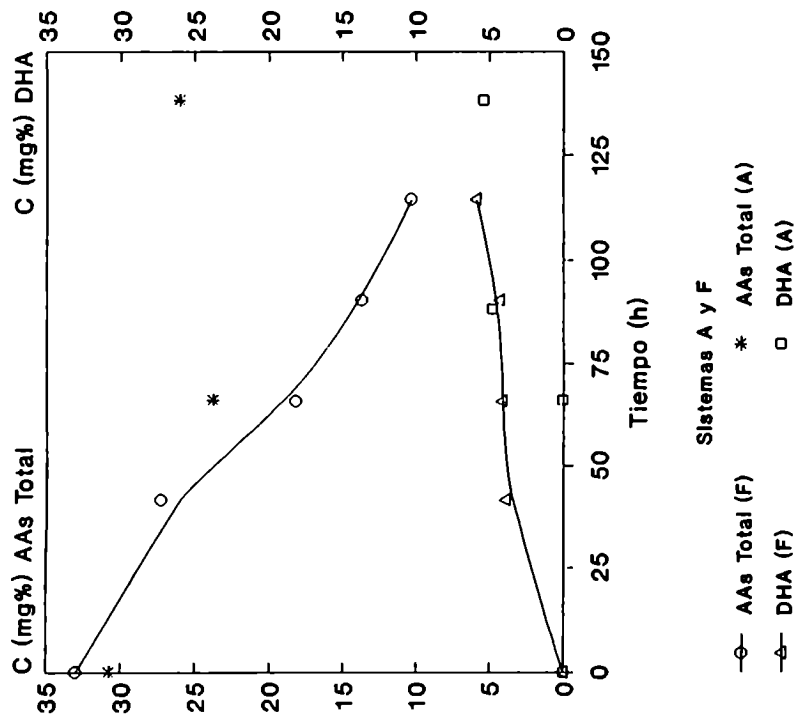
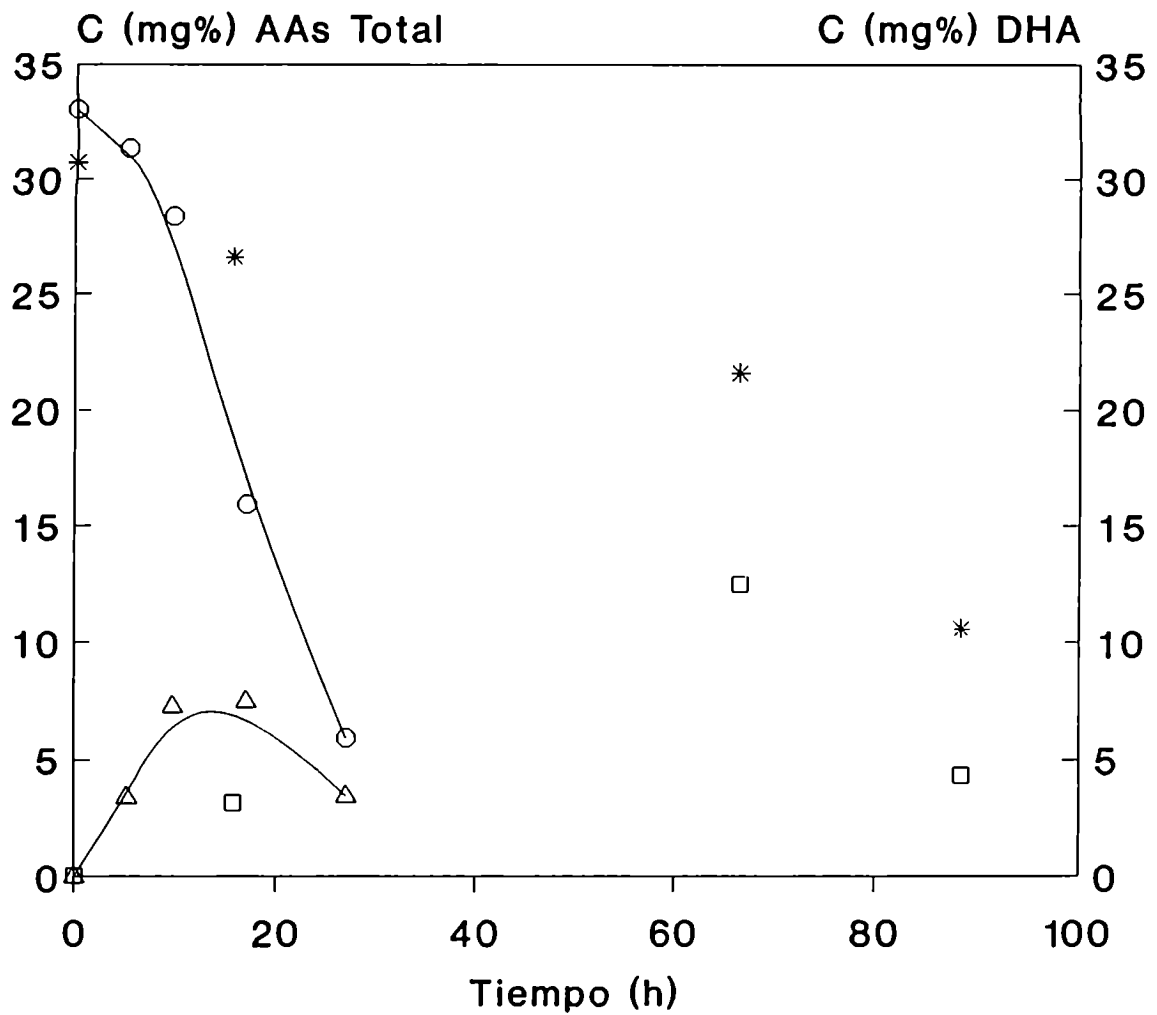


Fig. 97- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 70 C, en función del tiempo



Sistemas A y F

- AAs Total (F)                      \* AAs Total (A)
- △ DHA (F)                              □ DHA (A)

Fig. 99- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación del DHA, a 90 C, en función del tiempo

#### 4.8. EFECTO DE LA CAMARA DE AIRE EN EL ENVASADO

##### 4.8.1. Acido ascórbico

Con el objeto de conocer el efecto del oxígeno presente en el espacio de cabeza, sobre la destrucción del AAs y sobre el deterioro organoléptico concomitante, se envasaron sistemas modelo de composición análoga a los A y K pero con cámara de aire, según fuera explicado en el ítem 3.2. Los resultados obtenidos se indican en las Tablas 37 y 38.

**Tabla 37. Acido ascórbico. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb)10 <sup>3</sup> (1/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	70	2,5 ± 0,4	25 ± 3
	80	6,6 ± 0,1	
	90	18,6 ± 0,7	
A aer (Gluc/aire)	70	21,0 ± 1,6	14 ± 3
	80	47,5 ± 1,7	
	90	66,5 ± 3,2	
K (control)	70	1,5 ± 0,2	23 ± 3
	80	5,0 ± 0,1	
	90	9,7 ± 0,4	
K aer (Cont/aire)	70	118,2 ± 22,9	
	80	165,7 ± 15,8	
	90	216,0 ± 21,3	

k: velocidad específica  
Ea: energía de activación  
sb: desviación estándar

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95):

Sistema A: 70°<80°<90°  
Sistema A aer: 70°<80°<90°  
Sistema K: 70°<80°<90°  
Sistema K aer: 70°=80° 80°=90°  
70°<90°

Temp. 70°C: K<A<A aer< Kaer  
Temp. 80°C: K<A<A aer< Kaer  
Temp. 90°C: K=A<A aer< Kaer

**Tabla 38. Pardeamiento no enzimático. Constantes cinéticas de desarrollo de color a 420 nm.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	(k ± sb)10 <sup>4</sup> (UAb/h)	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	70	2,3 ± 0,2	34 ± 2
	80	10,2 ± 0,5	
	90	38,7 ± 0,4	
A aer (Gluc/aire)	70	9,0 ± 0,5	-- --
	80	54,6 ± 4,8	
	90	51,0 ± 3,2	
K (control)	70	0,5 ± 0,1	-- --
	80	1,2 ± 0,1	
	90	1,3 ± 0,2	
K aer (Cont/aire)	70	20,1 ± 1,8	
	80	24,2 ± 0,9	
	90	44,5 ± 5,3	

k: velocidad específica  
 Ea: energía de activación  
 sb: desviación estándar

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95):

Sistema A: 70°<80°<90°  
 Sistema A aer: 70°<80°=90°  
 Sistema K: 70°<80°=90°  
 Sistema K aer: 70°=80°<90°

Temp. 70°C: K<A<A aer<Kaer  
 Temp. 80°C: K<A<A aer=Kaer  
 Temp. 90°C: K<A<A aer=Kaer

El orden de las reacciones de destrucción del AAs en presencia de cámara de aire es uno respecto al AAs (Tabla 37). Análogos resultados fueron obtenidos por Joslyn y Miller (1949), Blaug y Hajratwala (1972) y Sahbaz y Somer (1993). Para el sistema conteniendo glucosa (A aer), el aumento de temperatura produjo un incremento significativo (P: 0,95) en la velocidad específica de destrucción del AAs. Para el sistema control (K aer) fue necesario un incremento de temperatura de 20°C para observar un aumento significativo de dicha velocidad. Se determinó que en presencia de oxígeno, como era de esperarse, el AAs se destruye significativamente

más rápido que en los sistemas equivalentes envasados sin espacio de cabeza, entre 70°C y 90°C. A su vez, comparando entre sí los sistemas envasados en aerobiosis (K aer y A aer), se halló que la glucosa presente se manifestaría como protectora del AAs en el rango 70° - 90°C, retardando significativamente su oxidación respecto del sistema sin humectante (K aer). Resultados análogos fueron obtenidos por Miller y Joslyn (1949) y por Joslyn y Suplee (1949). Los primeros trabajaron con soluciones de distintos azúcares, analizando el grado relativo de protección a la oxidación experimentada por el AAs. Los segundos autores hallaron que la presencia de glucosa inhibe la descomposición del DHA en 2,3-DCG, respecto a un medio sin humectantes presentes. A su vez, dicha protección aumentó con la concentración del hidrato de carbono. Es de destacar que en el presente trabajo se observó que, en ausencia de oxígeno, los hidratos de carbono aumentan la velocidad de destrucción del AAs en el rango 70° - 90°C (Tabla 37).

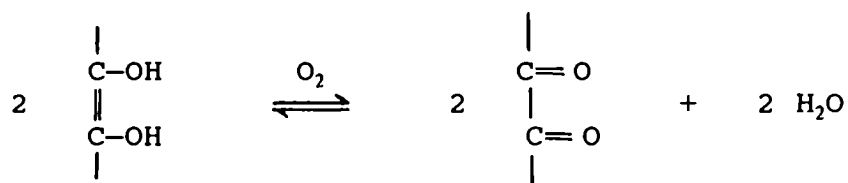
La velocidad de PNE observada, también es significativamente mayor en presencia de oxígeno que en su ausencia (Tabla 38). Comparando los sistemas K aer y A aer, se puede observar que el efecto de la presencia de azúcares depende de la temperatura considerada, en el rango 70° - 90°C. Así, a 70°C, el PNE es menor cuando están presentes azúcares (A aer); a 80° y 90°C, el PNE es mayor si hay azúcares, pero a 90°C las diferencias no son significativas. Debe recordarse que el sistema A aer tiene una actividad de agua de 0,94, a diferencia del sistema K aer que tiene actividad de agua aproximadamente 1,00. Los resultados obtenidos dependerían de cuál de los siguientes factores prevalece, según la temperatura:

- i) Al estar presente el hidrato de carbono, disminuye la velocidad de destrucción oxidativa del AAs (Tabla 37), entonces disminuiría la contribución al PNE de esta destrucción.

- ii) Al estar presente la glucosa, aumentaría el PNE por su contribución directa al mismo.
- iii) Al estar presente la glucosa, la actividad de agua es menor, lo cual aumenta el PNE.

En el análisis correspondiente debe tenerse en cuenta que el AAs, por el mecanismo oxidativo se destruye más rápidamente (Kurata y Sakurai, 1967a; Burton y col., 1970; Waletzco y Labuza, 1976; Lin y Agalloco, 1979) y, por lo tanto, aporta más carbonilos a un dado tiempo que cuando su destrucción procede fundamentalmente, por el mecanismo no oxidativo y, por lo tanto, la menor velocidad de destrucción oxidativa del AAs en el medio con glucosa (A aer) puede llegar a pesar en el menor PNE resultante. Además, debe recordarse que a un pH de 3,5 no está especialmente favorecida la caramelización de la glucosa.

Es de destacar que el PNE no depende de la presencia de oxígeno para su ocurrencia, pero el oxígeno contribuiría al mismo a través de la generación de carbonilos activos por reacciones del tipo:



Como se puede ver en la Tabla 15, la incorporación de AAs al sistema A y al A aer produce igual incremento en la velocidad de pardeamiento (~ 2,4). En cambio, el incremento en el PNE provocado por la incorporación de AAs es mucho mayor para el sistema K aer que para el K. Evidentemente, el PNE en estos sistemas está determinado por el AAs y éste se destruye más rápidamente por vía oxidativa, lo que determina la mayor velocidad del PNE en presencia de oxígeno.

En aerobiosis, la energía de activación de la destrucción del AAs en el sistema con glucosa (A aer) es menor que la misma en ausencia de cámara de aire, según se



ve en la Tabla 37 (sistema A). Labuza (1980) reportó igual tendencia: en un alimento de humedad intermedia, la energía de activación de la destrucción del AAs era de 24 kcal/mol en ausencia de oxígeno y de 10 kcal/mol en presencia de este gas.

Para el PNE de ambos sistemas en presencia de cámara de aire y para la destrucción del AAs en el sistema K aer no pudo calcularse la energía de activación porque algunas temperaturas no presentaban diferencias significativas (Tablas 37 y 38).

Cuando se calculó  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$  para el sistema conteniendo glucosa y envasado con cámara de aire (A aer), se observó que los resultados alinean con los de Blaug y Hajratwala (1972). Ellos estudiaron la cinética de oxidación del AAs a pHs entre 3,52 y 7,22 en solución acuosa de fuerza iónica 0,4 dada por un buffer acetato o fosfato, según el pH de trabajo, y con agregado de cloruro de potasio. Las temperaturas a las que trabajaron fueron entre 67° y 85°C. En la Tabla 39 se observan los resultados obtenidos por estos autores y los cálculos de  $\Delta H^\ddagger$  y de  $\Delta S^\ddagger$  efectuados a partir de ellos. En la misma, se ven también las velocidades de destrucción obtenidas en el presente trabajo para la destrucción del AAs a pH 3,5, en aerobiosis y en presencia de glucosa 36% P/P ( $a_w$  0,94). En la Figura 100 se observa como quedan ubicados los puntos resultantes del presente trabajo, con respecto a la línea de ajuste correspondiente a los resultados obtenidos por dichos autores. Todos estos sistemas compartirían la misma línea isocinética porque tienen el mismo mecanismo de destrucción del AAs: el oxidativo. Los resultados del trabajo de Blaug y Hajratwala (1972) no cumplen con el test estadístico de Krug y col. (1976), con lo que en realidad no se trataría de una verdadera compensación, según lo analizado por estos últimos autores. De todas maneras, se debe destacar la similitud de los datos de Blaug y Hajratwala y los nuestros, para pH 3,5.

Tabla 39. Datos de destrucción de AAs del trabajo de Blaug y Hajratwala (1972) y del presente trabajo.

SISTEMA MODELO	t (°C)	k (1/h)	kf (1/s)	Ea*	$\Delta H^{**}$	$\Delta S^{***}$	$\Delta G^{**}$
A aer (Gluc/aire)	70	2,10E-02	5,83E-06	14	13,31	-0,0413	27,48
	80	4,75E-02	1,31E-05		13,29	-0,0411	27,81
	90	6,65E-02	1,83E-05		13,27	-0,0418	28,44
pH 3,52	67	1,79E-02	4,97E-06	12	11,52	-0,0465	27,32
	72	2,43E-02	6,75E-06		11,51	-0,0465	27,56
	77	3,37E-02	9,36E-06		11,50	-0,0465	27,78
	80	3,93E-02	1,09E-05		11,49	-0,0466	27,94
	85	4,25E-02	1,18E-05		11,48	-0,0470	28,32
	85	4,62E-02	1,28E-05		11,48	-0,0469	28,26
pH 4,55	59,5	1,78E-02	4,94E-06	11	10,24	-0,0494	26,64
	67	2,74E-02	7,61E-06		10,22	-0,0495	27,03
	72	3,58E-02	9,94E-06		10,21	-0,0495	27,30
	80	5,50E-02	1,53E-05		10,19	-0,0496	27,70
	85	5,63E-02	1,56E-05		10,18	-0,0501	28,12
	85	5,85E-02	1,63E-05		10,18	-0,0500	28,09
pH 5,45	59,5	1,96E-02	5,44E-06	10	9,44	-0,0516	26,58
	67	2,57E-02	7,14E-06		9,42	-0,0519	27,08
	72	3,36E-02	9,33E-06		9,41	-0,0520	27,34
	80	4,68E-02	1,30E-05		9,39	-0,0522	27,81
	80	4,84E-02	1,34E-05		9,39	-0,0521	27,79
	85	5,59E-02	1,55E-05		9,38	-0,0523	28,12
pH 3,60	59,5	1,79E-02	4,97E-06	8	7,14	-0,0587	26,64
	67	2,20E-02	6,11E-06		7,12	-0,0590	27,18
	72	2,58E-02	7,17E-06		7,11	-0,0592	27,52
	77	3,04E-02	8,44E-06		7,10	-0,0593	27,85
	85	4,15E-02	1,15E-05		7,08	-0,0594	28,34
	Media						

\* (kcal/mol)

\*\* (kcal/°K mol)

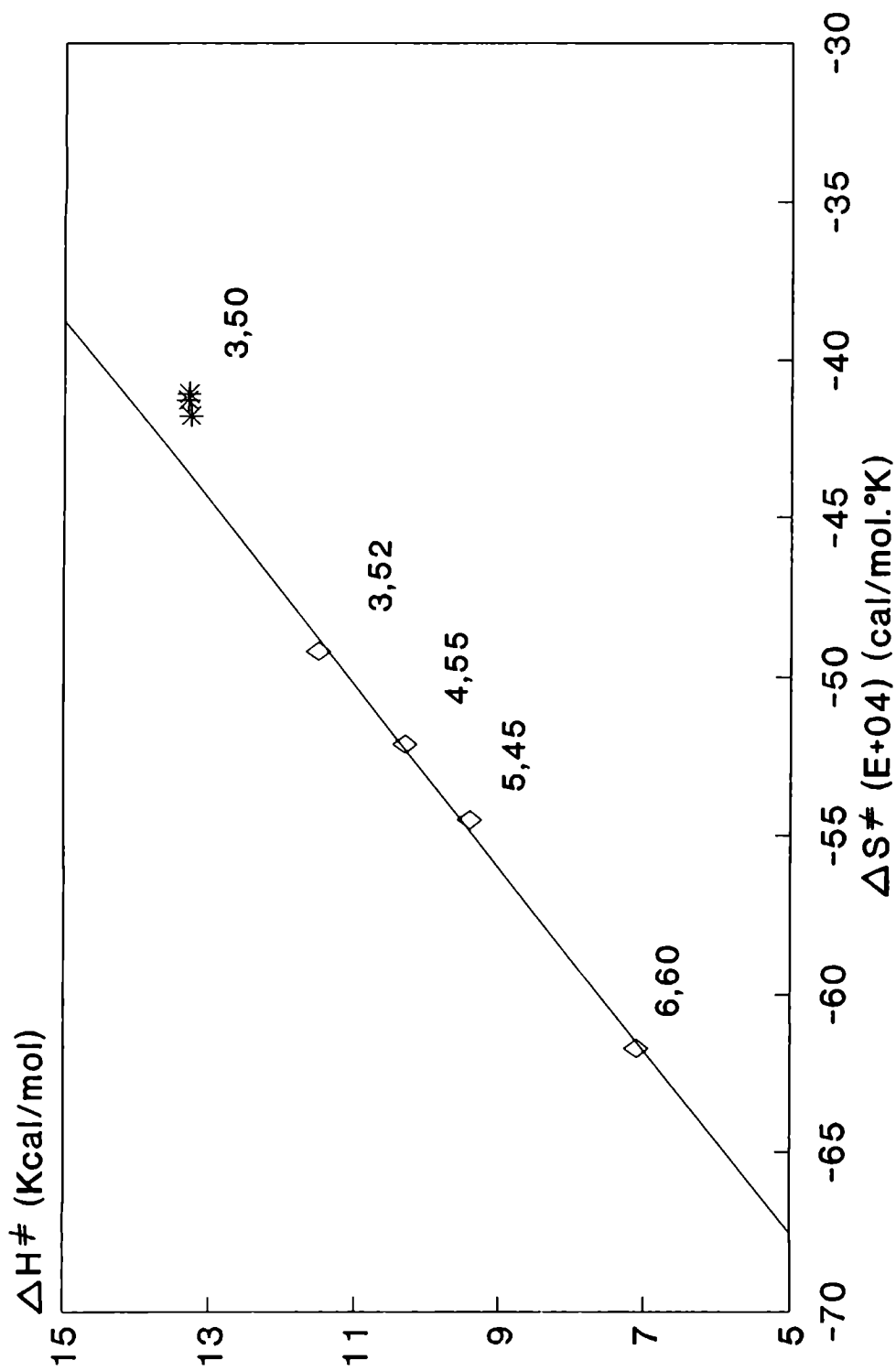


Fig. 100- Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de la ecuación de Arrhenius para la oxidación del AAs

En los sistemas modelo envasados con cámara de aire (A aer y K aer) y tratados a **alta temperatura** (70° a 90°C), está ocurriendo una reacción en **fase heterogénea** que involucra la difusión del oxígeno desde el espacio de cabeza hacia la solución, donde ocurre la reacción de destrucción aeróbica del AAs. En el sistema K aer hay más alta difusividad del oxígeno en el seno del líquido que en el A aer por la menor viscosidad. En general, la solubilidad del oxígeno en ambos sistemas es baja por las tan elevadas temperaturas de tratamiento (70° a 90°C). En estos sistemas, la **disponibilidad** de oxígeno aceleraría la destrucción del AAs por la ruta aeróbica o vía oxidativa. Aunque según Kurata y Sakurai (1967a), una considerable cantidad de AAs es degradada a través de la vía **no oxidativa**, aún bajo condiciones de almacenamiento oxidativo, pero a menor velocidad.

Se hizo el seguimiento de la concentración de oxígeno disuelto en los sistemas envasados con espacio de cabeza, para aclarar las tendencias observadas. Al medir dicha concentración en el sistema A aer, se comprobó que existió el mismo perfil que en el caso de cualquier sistema envasado **sin** espacio de cabeza (Fig. 101). Sin embargo, en el primer caso (A aer), la velocidad de destrucción del AAs en presencia de oxígeno resultó significativamente mayor que en el sistema A. En la ruta aeróbica, la velocidad de transferencia de oxígeno y la velocidad de la reacción química determinan la velocidad real de pérdida del nutriente (Mohr, 1980). Evidentemente, la penetración del oxígeno a partir de la fase gaseosa es dificultada por la alta viscosidad relativa del medio con glucosa (A aer). Probablemente, entonces, apenas el oxígeno proveniente de la fase gaseosa se disuelve en la fase líquida, es consumido en la destrucción del AAs resultando una concentración remanente baja de dicho gas en la solución, durante el tiempo estudiado. Mohr (1980), en su análisis de la transferencia de masa del oxígeno durante la destrucción del AAs en un alimento de humedad intermedia, postuló como muy factible que

la reacción química sea lo suficientemente rápida para que todo el oxígeno reaccione en una delgada película en contacto inmediato con la interfase entre el alimento y la fase gaseosa. El reportó que si la solubilidad del oxígeno en la matriz del alimento se considerara equivalente a la solubilidad del oxígeno en el agua pura, el número de moles de oxígeno disuelto en el alimento en cualquier instante sería tan bajo que sería necesario que el oxígeno fuera continuamente transportado desde la fase gaseosa hacia el alimento para que la oxidación procediera. Este transporte de oxígeno ocurriría en dos etapas. Primero, el oxígeno debería disolverse en la interfase entre la fase gaseosa y el alimento y luego sería transportado al seno del alimento.

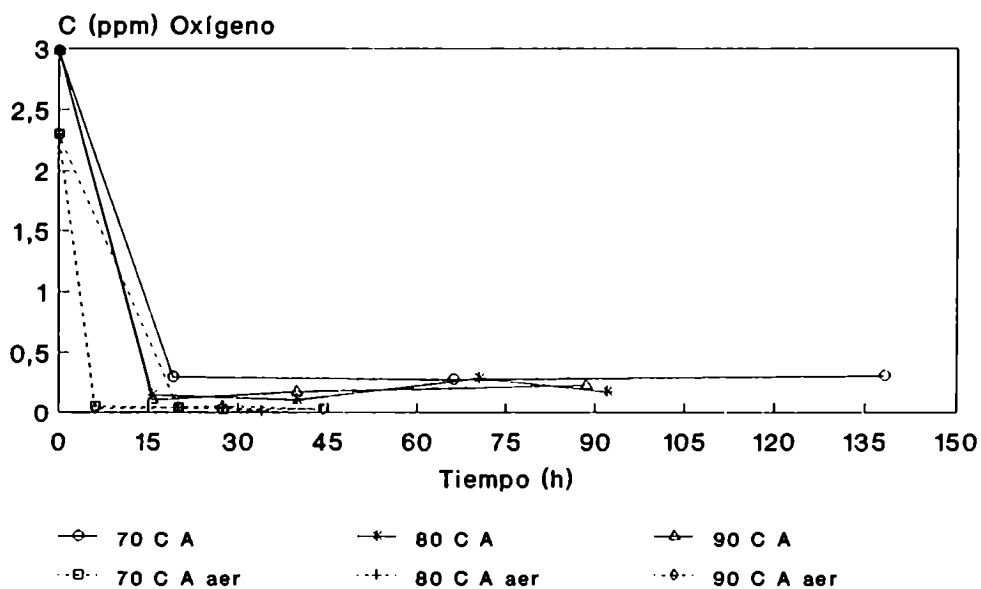


Fig. 101- Perfiles de variación del consumo de oxígeno disuelto en los sistemas A y A aer, en función del tiempo

Cuando se midió la concentración de oxígeno disuelto en el sistema sin humectantes, envasado con espacio de cabeza (K aer), el perfil en el tiempo resultó diferente del obtenido en el resto de los sistemas modelo y condiciones estudiadas (Fig. 102). En este caso, se observó que para una concentración remanente de AAs de 10,8 mg%, el sistema K aer presenta una concentración de oxígeno de 1,5 ppm a 80°C, en cambio el sistema K presenta una concentración de oxígeno de 0,16 ppm a igual temperatura para un tenor de AAs de 13,5 mg%. Aquí el oxígeno se **renueva** en el medio líquido con mayor facilidad que en el sistema A aer debido a la menor viscosidad y, en consecuencia, existe en cada instante mayor concentración de oxígeno remanente. Probablemente sea éste el motivo de la mayor velocidad de destrucción aeróbica del AAs observada en el sistema K aer (Tabla 37).

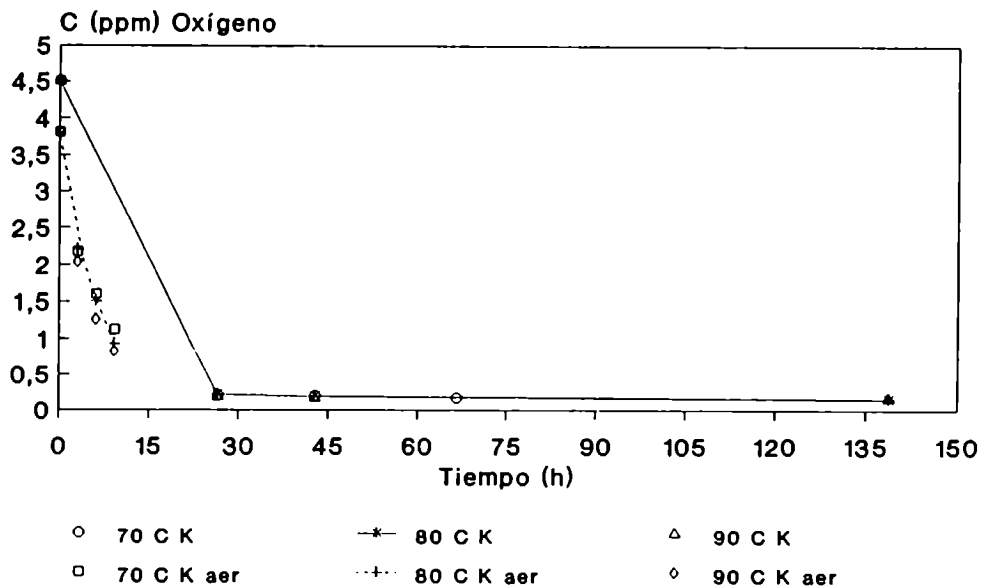


Fig. 102- Perfiles de variación del consumo de oxígeno disuelto en los sistemas K y K aer, en función del tiempo

#### 4.8.2. Acido ascórbico total (Vitamina C)

##### Sistema K aer

En la Tabla 40 se observa que el orden de la destrucción del AAST en el sistema control, envasado con espacio de cabeza (K aer) es uno, aumentando significativamente la velocidad de degradación con la temperatura al pasar de 80° a 90°C. Al evaluar el AAs, se comentó que era necesario un aumento de temperatura de 20°C, en este sistema, para detectar un efecto de dicha variable en la destrucción de la vitamina, no notándose diferencias significativas al aumentar la temperatura de 80° a 90°C. En el caso ahora analizado, probablemente sea el efecto de la variación del DHA con la temperatura, el que determine la tendencia observada en el perfil cinético del AAST. Así, si se observa en el gráfico de la Figura 103, puede verse que un aumento de la temperatura de 70° a 80°C produce un incremento en la concentración de DHA a cada tiempo analizado. En cambio, el aumento de 80° a 90°C produce concentraciones menores de DHA a cada tiempo; probablemente ello se deba a que a 90°C comienza a predominar la reacción de destrucción del DHA, favorecida no sólo por la mayor temperatura, sino también por la alta concentración de aquél formada (Joslyn y Supplee, 1949) o bien a que la formación de DHA se ve limitada por la baja solubilidad del oxígeno a 90°C. Según datos de Perry y col. (1963), el volumen de oxígeno (reducido a 0°C y 760 mm de mercurio) que ha sido absorbido por un volumen de agua cuando la presión del gas por sí mismo, sin la tensión del agua, es 760 mm de mercurio ( $\alpha$ ) es de 0,0176 a 80°C y de 0,0172 a 90°C, lo que en realidad mostraría que existe una diferencia muy pequeña en la solubilidad de dicho gas a temperaturas tan altas y entonces descalificaría la segunda razón. Al respecto, el efecto de la temperatura sobre la concentración de DHA también se observa para el sistema control en anaerobiosis (K) (Fig. 104). Debemos remarcar que a tiempos menores de 5 horas, la concentración de DHA en

anaerobiosis (sistema K) es menor que en aerobiosis, a 70° y 80°C. A tiempos mayores, probablemente la alta concentración de DHA presente en condiciones de aerobiosis, a cada temperatura, determine su alta velocidad de destrucción a ácido 2,3-DCG (Joslyn y Supplee, 1949), agotando al DHA formado y mostrando así una menor concentración resultante del mismo que en anaerobiosis. Se trata entonces de un balance continuo entre la formación y la destrucción del DHA.

**Tabla 40. Acido ascórbico total. Constantes cinéticas de destrucción.**

SISTEMA MODELO	Temp. (°C)	Orden	Unidad	(k ± sb)10 <sup>3</sup>	Ea ± sb (Kcal/mol)
A (Gluc/3,5)	70	NR	mg%/h	29,5 ± 18,6	-- --
	80	0	mg%/h	119,1 ± 12,2	
	90	0	mg%/h	197,7 ± 28,7	
A aer (Gluc/aire)	70	0	mg%/h	263,7 ± 27,2	-- --
	80	0	mg%/h	457,1 ± 137,0	
	90	0	mg%/h	587,1 ± 119,7	
K (control)	70	1	1/h	1,2 ± 0,2	-- --
	80	1	1/h	4,2 ± 0,3	
	90	1	1/h	9,2 ± 0,6	
K aer (Cont/aire)	70	1	1/h	109,0 ± 14,5	
	80	1	1/h	135,3 ± 12,3	
	90	1	1/h	197,5 ± 14,9	

k: velocidad específica

Ea: energía de activación

sb: desviación estándar

NR: no regresión

\* Diferencias significativas entre las constantes de velocidad (P: 0,95):

Sistema A: 80°<90°

Sistema A aer: 70°=80° 80°=90° 70°<90°

Sistema K: 70°<80°<90°

Sistema K aer: 70°=80°<90°

Temp. 70°C: K<K aer A<A aer

Temp. 80°C: K<K aer A<A aer

Temp. 90°C: K<K aer A<A aer



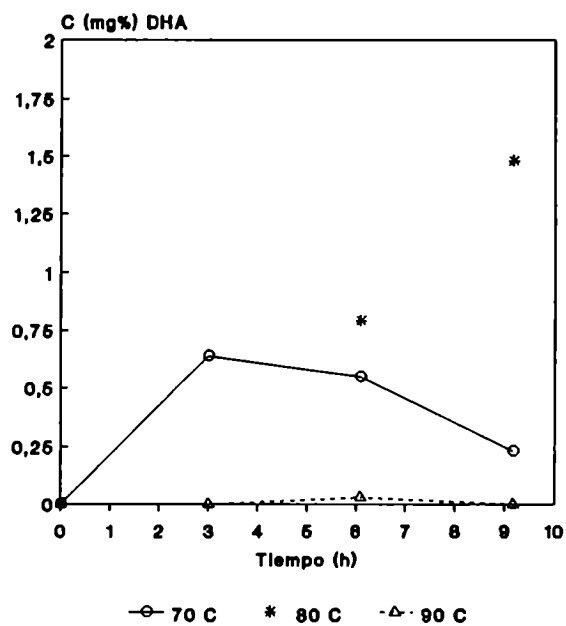


Fig. 103- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, para el sistema K aer

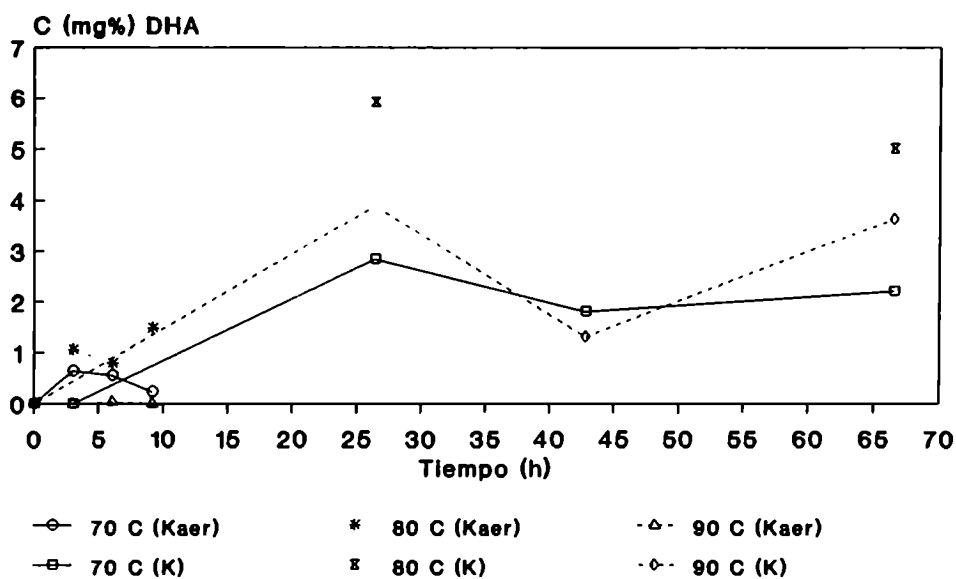


Fig. 104- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, para los sistemas K y K aer

Si comparamos los datos de la Tabla 40, vemos que la constante de velocidad de destrucción del AAST a cada temperatura es significativamente mayor en aerobiosis que en anaerobiosis, mostrando el efecto negativo del oxígeno sobre este nutriente.

### Sistema A aer

En este sistema, los datos obtenidos de destrucción de vitamina C ajustaron estadísticamente a una cinética de orden cero, según se observa en la Tabla 40. Sin embargo, como la degradación alcanzada por el AAST a 80°C fue menor del 50%, la incertidumbre en la determinación del orden correspondiente es alta. En condiciones aeróbicas, el sistema conteniendo glucosa a pH 3,5 muestra sólo un aumento significativo de la velocidad de destrucción del AAST al aumentar la temperatura en 20°, desde 70° hasta 90°C (Tabla 40). En la Figura 105 puede observarse que a tiempos menores de 40 horas, el DHA muestra un aumento en su concentración al aumentar la temperatura de 70° a 80°C. A 90°C, la concentración resultante a cada tiempo es prácticamente la misma que aquélla encontrada a 80°C, mostrando nuevamente la influencia de la destrucción del DHA a 2,3-DCG y/o el efecto de la disminución de la solubilidad del oxígeno a 90°C en la formación del DHA.

A tiempos menores de 30 horas, se puede observar en la Fig. 106 la mayor concentración alcanzada de DHA, a cada tiempo, en presencia de cámara de aire (Aaer), respecto del mismo sistema envasado sin espacio de cabeza (A).

Comparando los datos de la Tabla 40 para A y Aaer, vemos que la presencia de cámara de aire produce un aumento significativo ( $P: 0,95$ ) en la velocidad de destrucción del AAST, mostrando el efecto negativo del oxígeno en este nutriente.

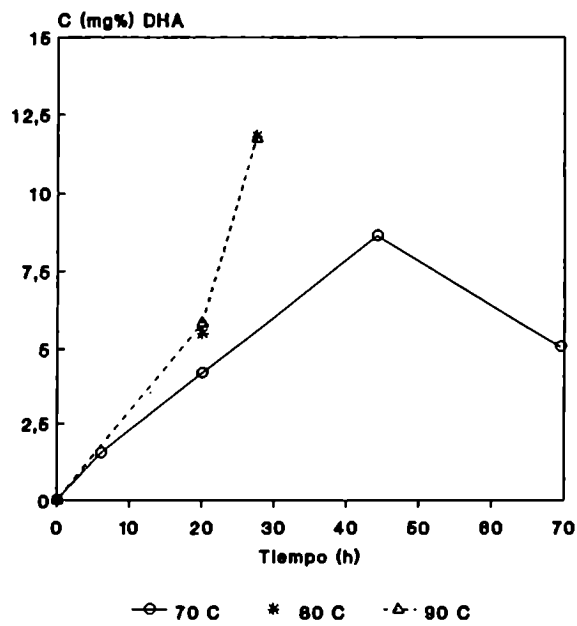


Fig. 106- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, para el sistema A aer

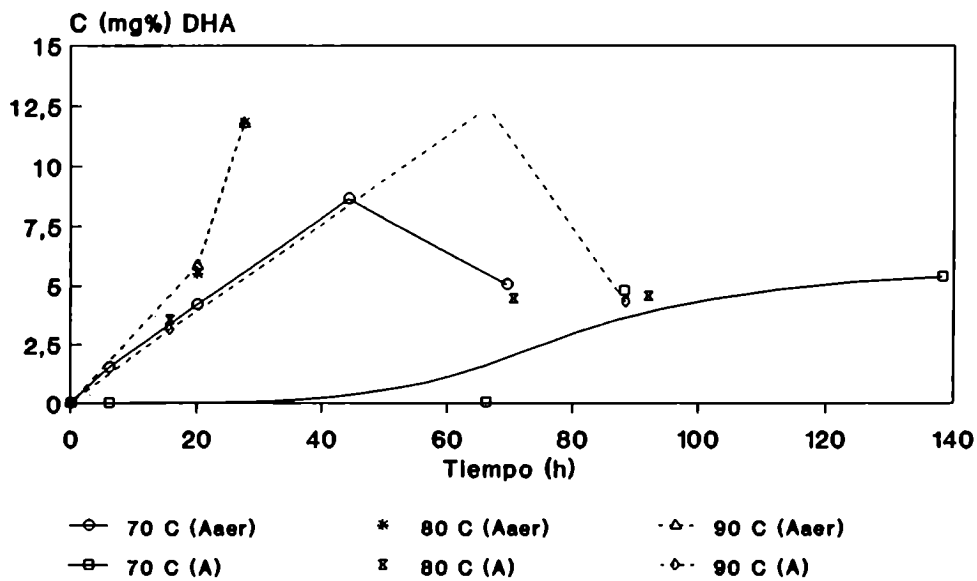


Fig. 106- Perfiles de formación del DHA en función del tiempo, para los sistemas A y A aer

## Comparación Aaer-Kaer

Al comparar el DHA presente en los sistemas Kaer y Aaer (Figs. 107, 108 y 109), se observa una mayor concentración del mismo a cada tiempo en el sistema conteniendo glucosa (A aer). Si bien la presencia de este humectante dificulta la difusión del oxígeno y, por lo tanto, debería disminuir la formación de DHA, parecería que en realidad prevalece el efecto depresor de la destrucción del DHA a 2,3-DCG debido a la presencia del azúcar (Joslyn y Supplee, 1949), según ya se comentó.

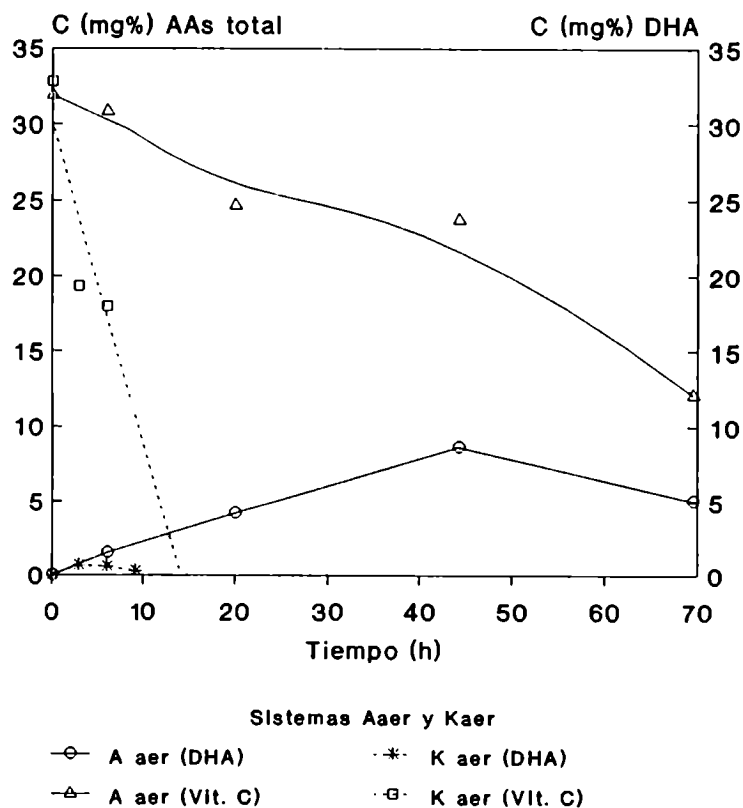


Fig. 107- Perfiles de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación de DHA, a 70 C, en función del tiempo

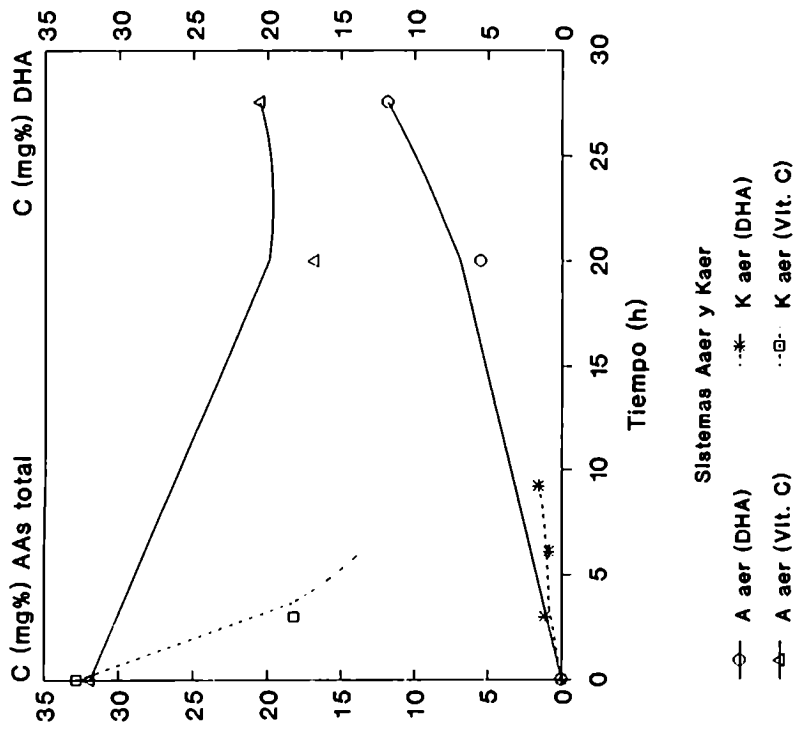


Fig. 108- Perfil de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación de DHA, a 80 C, en función del tiempo

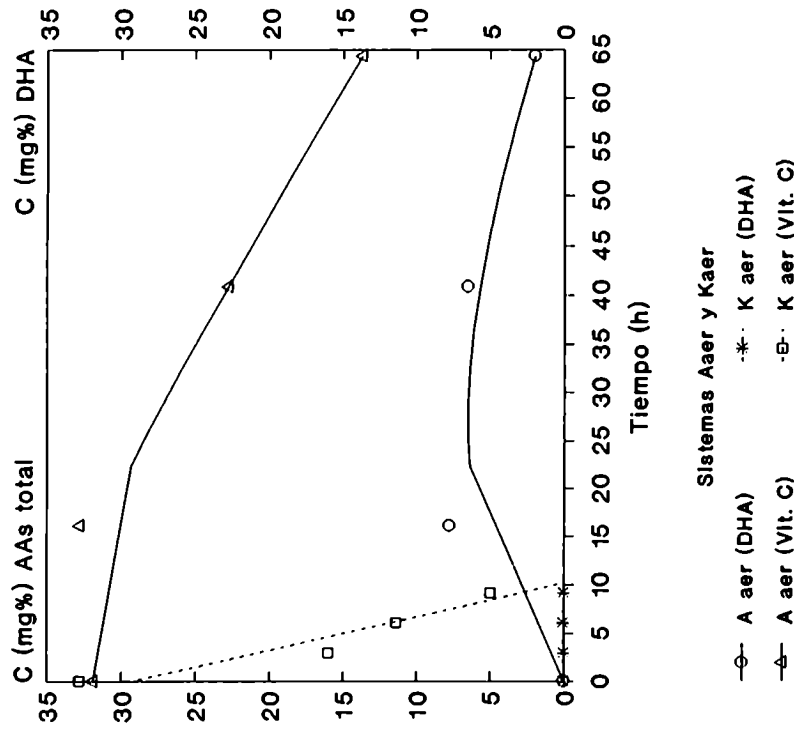


Fig. 109- Perfil de destrucción del AAs total (vitamina C) y de formación de DHA, a 90 C, en función del tiempo

En cuanto al AAsT, éste se destruye más lentamente en el medio con glucosa, como se puede observar en las figuras 106 a 108. Esta tendencia sería el resultado del efecto de la presencia de la glucosa sobre la destrucción del AAs, en condiciones de aerobiosis, y del DHA, según lo ya destacado. Debe informarse que distintos autores reportados por Labuza (1980), han informado que la depresión de la actividad de agua produce una disminución de la constante de velocidad de destrucción del AAs en distintos alimentos. El sistema A aer, evidentemente tiene una actividad de agua menor a la del sistema K aer, ajustándose, desde este punto de vista, a lo reportado por ellos.

## 5 - CONCLUSIONES

De los resultados presentados y discutidos previamente en el presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1 - El aumento de temperatura, en general, produce un aumento de la constante específica de velocidad de destrucción del ácido L-ascórbico (AAs) y del ácido L-ascórbico total (AAsT), definido este último como "actividad de vitamina C" (AAs + DHA). El efecto de la temperatura no es claro para el ácido deshidroascórbico (DHA) por superponerse los fenómenos de formación y de destrucción simultánea del mismo.

2 - En los sistemas modelo acuosos de actividad de agua 0,94 y en el sistema sin humectantes o control, el AAs se destruye según una cinética de primer orden respecto de la concentración del ácido, tanto en los sistemas envasados en anaerobiosis como en aquéllos envasados con cámara de aire. Sólo en el sistema modelo constituido por glucosa y L-lisina, la destrucción del AAs ajustó estadísticamente a un orden cero de reacción.

3 - La concentración de oxígeno disuelto alcanzada inicialmente en cada sistema como consecuencia de su preparación, cae rápidamente en todos los casos (coincidiendo con la más rápida pérdida inicial del AAs y con la acumulación del DHA), para luego mantenerse en un valor mínimo, despreciable. La excepción la constituye el sistema sin humectantes envasado con cámara de aire, en el que la concentración de oxígeno disuelto cae paulatinamente en el lapso estudiado.

4 - En general, el DHA evoluciona aumentando con el tiempo a cada temperatura estudiada, para luego alcanzar constancia o caer. Esto es el resultado del agotamiento del oxígeno disuelto en la solución y de la facilidad con la que el DHA se destruye a ácido 2,3-DCG, la que depende del pH de la solución y de la presencia de humectantes.

Hacia el final del lapso estudiado en muchos de los sistemas y condiciones analizadas, la concentración de DHA remanente llega a ser comparable o aún mayor que la correspondiente de AAs, por lo que se concluye que es importante evaluar el contenido de AAsT como índice de dicha actividad vitamínica.

5 - El AAs total o vitamina C (AAs + DHA) se destruiría según una cinética de orden cero o uno, dependiendo del sistema en cuestión. Ello se debería a que dichas constantes de velocidad son el resultado de la destrucción del AAs y de la formación-destrucción del DHA, por lo que resulta compleja.

6 - Los resultados obtenidos para el PNE (medido por aumento de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo), ajustaron estadísticamente a una cinética de orden cero respecto de la absorbancia. En algunos sistemas modelo apareció un período de inducción inicial.

El grado de pardeamiento alcanzado por el sistema para una misma concentración de AAs remanente, fue variable, dependiendo de la composición del medio, del lapso transcurrido y de la existencia o no del período de inducción inicial. Las constantes de velocidad de desarrollo de color aumentaron, en general, con la temperatura.

7 - **A las temperaturas** que corresponderían a las de **procesamiento térmico** de un producto (70°, 80° y 90°C) ensayadas en este trabajo, se observó que:



### **En presencia de cámara de aire:**

7.1) La presencia de cámara de aire en el envase contenedor del sistema de actividad de agua 0,94, conspira decididamente contra la estabilidad de la vitamina C, de tal manera que es indispensable asegurar la ausencia de aire (y por lo tanto de oxígeno libremente disponible) en el envase del producto.

La presencia de la cámara de aire sería también responsable del incremento significativo del pardeamiento del sistema (a pH 3,5), tanto en el sistema sin humectantes como en aquél con glucosa.

En aerobiosis, la glucosa desempeña un papel de protección de la destrucción de la vitamina C y su contribución al pardeamiento depende de la temperatura considerada en el rango 70°-90°C.

### **En ausencia de cámara de aire:**

7.2) El aumento de pH de 3,5 a 5,0 produce un aumento de la constante de velocidad específica de destrucción del AAs y una tendencia al aumento de la constante de destrucción del AAs total, entre 70° y 90°C.

El pardeamiento no enzimático (PNE) aumenta con el aumento del pH. El efecto del pH sobre las energías de activación de la destrucción del AAs y del PNE no es claro.

La acidificación del sistema hasta pH no mayor de 3,5, en un medio acuoso donde el humectante es la glucosa, aseguraría por lo tanto la mayor estabilidad del AAs (y de la vitamina C) y, además, provocaría la inhibición de la caramelización de la glucosa. En consecuencia, habría mayor calidad nutritiva y organoléptica respecto de los mismos sistemas con mayor pH.

7.3) No sólo el pH, sino también la sustancia acidificante utilizada, debería ser tomada en cuenta para la formulación de un producto de elevada actividad de agua. El

ácido cítrico demostró mejores aptitudes en la prevención de la destrucción del AAs (y de la vitamina C) y en la inhibición del pardeamiento del sistema glucosado, a pH 3,5, respecto del ácido fosfórico. Esto se debería al mayor poder complejante de iones metálicos del primer ácido respecto del último. No se observa un efecto decisivo del acidificante elegido sobre el perfil cinético del DHA.

7.4) La presencia en el medio acuoso con glucosa de un aminoácido como L-lisina en una concentración de 1,7% P/P, el que reacciona químicamente con dicho azúcar a través de la reacción de Maillard, deterioraría en grado sumo al sistema, tanto desde el punto de vista nutricional como organoléptico. Tanto el AAs como la vitamina C (AAs total) se destruyen rápidamente y el PNE es elevado.

7.5) La presencia de 10 ppm de estaño (II) en un medio glucosado de actividad de agua 0,94 y pH 3,5 aumentaría poco, pero significativamente, la velocidad de destrucción del AAs y del AAsT a 80° y a 90°C. El pardeamiento del medio sólo se ve aumentado significativamente a 70° y a 80°C, pero no habría diferencia a 90°C, respecto del mismo sistema sin estaño (II). Se exaltaría la destrucción del AAs a las altas temperaturas, por un efecto de masa al consumir productos de su degradación en el ciclo del PNE propio y/o de la glucosa. No se vio un efecto general sobre el perfil cinético del DHA.

7.6) Se comprobó que el reemplazo de ácido sórbico por ácido propiónico como agente antimicrobiano en el sistema glucosado de pH 3,5 no produjo un efecto claro en el AAs en el rango de temperatura estudiado. A 70° y 90°C no hubo diferencia significativa en la estabilidad del AAs en presencia de cualquiera de los dos conservadores químicos. Sí hubo, en cambio, un aumento pequeño, pero significativo, de la velocidad de destrucción del AAs en presencia de ácido propiónico a 80°C. En presencia de ácido propiónico el DHA es levemente mayor a 80°C para cada tiempo considerado. Esto

determina un efecto nulo del cambio del antimicrobiano sobre la degradación del AAsT.

En cuanto al PNE del medio, se vió aceleración ligera del mismo a 80°C y desaceleración a 90°C, respecto del sistema con ácido sórbico.

Los distintos efectos observados sobre el AAs, DHA, AAsT y PNE en el rango 70°-90°C al reemplazar ácido sórbico por propiónico, hacen aconsejable el estudio de cada caso particular considerando también los requerimiento de actividad antimicrobiana. Sin embargo puede, en principio, decirse que en el rango estudiado no existe un efecto significativo del cambio de antimicrobiano en la degradación del AAsT.

7.7) La presencia de 150 ppm de bisulfito de sodio no previene la destrucción del AAs ni de la vitamina C en el medio glucosado a pH 3,5, a las temperaturas de procesamiento térmico (70° a 90°C). Tampoco aporta ningún beneficio desde el punto de vista de la prevención del pardeamiento a 80° y 90°C. A estas temperaturas, se ven favorecidas las reacciones del PNE por lo que pierde eficiencia el efecto inhibitor del bisulfito.

7.8) Entre los humectantes ensayados en el presente trabajo a las temperaturas de procesamiento, aquéllos que no tienen carbonilos activos en las reacciones de PNE (caramelización y de interacción con el AAs), que son las reacciones que están particularmente favorecidas a altas temperaturas, dada su alta energía de activación ( $E_a$ ), tales como el sorbitol, son estabilizantes del AAs y de la vitamina C. El comportamiento del sorbitol no resultó diferente del de aquel sistema sin agregado de humectantes (K), envasado también sin cámara de aire.

Comparando la glucosa y la sacarosa, esta última resultó ser la más deteriorante de la vitamina, por ser la más activa en las reacciones citadas. Esto es porque a pH 3,5 el disacárido (no reductor) se hidroliza rápidamente generando

fructosa, relativamente más activa que la glucosa en la caramelización y en su interacción con el AAs.

El efecto acelerante de la destrucción del AAs y del AAsT se debería a la interacción de las vías de destrucción de los mismos con la de PNE de los azúcares.

**8 - A las temperaturas** que corresponderían a las de **almacenamiento** de un producto (**24°; 33° y 45°C**) ensayadas en este trabajo, se observó que:

8.1) El agregado de 150 ppm de bisulfito de sodio al sistema glucosado de pH 3,5 sólo inhibe significativamente el PNE del sistema a 24°C, mientras que retarda el deterioro del AAs tanto a 24° como a 33°C. Esto significaría que el bisulfito protegería al producto a las bajas temperaturas.

8.2) Entre los humectantes usados, a las temperaturas de almacenamiento, la sacarosa y la glucosa (en mayor grado) protegieron al AAs y al AAsT.

A 24°C no hubo diferencia significativa en el PNE del medio entre los tres humectantes y el sistema control (K). A 33°C y a 45°C aumentó significativa pero ligeramente, la velocidad del PNE de los sistemas con sacarosa (E) y glucosa (A) respecto del de los sistemas con sorbitol (D) y control (K). En realidad, en este rango de temperaturas, las reacciones de PNE no se encuentran significativamente activadas respecto de las reacciones de destrucción del AAs. En consecuencia, la estabilización de este nutriente se explicaría por el diferente comportamiento fisicoquímico del entorno (azúcar-solvente), diferencia que se manifiesta sólo en el rango bajo de temperaturas analizado. Esta diferencia desaparecería a temperaturas mayores a 70°C, debido a la "deformación" o "fluidificación" de la estructura del solvente en su relación con el humectante, tal como se observa a través de la función de distribución radial del agua.

Estos **fenómenos soluto-solvente** deberán ser tenidos muy en cuenta en las formulaciones, pues un humectante que tendría efectos beneficiosos durante un procesamiento térmico a temperaturas mayores a 70 °C podría ya no tenerlos a las temperaturas de almacenamiento del producto en estante (24° a 45°C), aún cuando no manifestase deterioro organoléptico.

9 - Se comprobó la existencia de un alineamiento significativo de los resultados obtenidos en un plano  $\Delta H^\ddagger$  versus  $\Delta S^\ddagger$ . Esto así ocurrió con todos los sistemas conteniendo AAs y envasados sin cámara de aire o espacio de cabeza, donde el único mecanismo de destrucción fue la vía anaeróbica. Ello mostró la existencia de un **efecto solvente**, el que determinó la diferente estabilidad del AAs en los distintos sistemas y a las distintas temperaturas. Este efecto del solvente consistiría en que el agua se reacomoda alrededor de los reactivos y productos de una reacción para disminuir los cambios de energía libre.

En consecuencia, **no sólo la actividad de agua del sistema debería ser considerada** como parámetro de estabilidad sino que **también debe ser tenido muy en cuenta cómo el solvente está "estructurado"**.

Los humectantes (llámense azúcares o polioles) constituyen entonces, per se, un factor fundamental en su relación con el agua, **independientemente del hecho** que determinen una dada actividad de agua, según la concentración en la que son incorporados al sistema.

## 6 - APENDICES

### APENDICE 1: TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

#### A1.1. TEORIA DEL ERROR

##### A1.1.1. Exactitud y precisión

**Exactitud, precisión, error** y el tratamiento de datos experimentales son conceptos fundamentales a ser tenidos en cuenta cuando se encara el diseño de un trabajo de laboratorio.

La **exactitud** de una medición describe la diferencia entre el valor observado o medido y el valor verdadero. Por lo tanto, una medición será tanto más exacta cuanto más se acerque al valor verdadero.

La **precisión** de un conjunto de mediciones del mismo objeto o de la misma cantidad, describe las diferencias que se producen entre dichas mediciones individuales en sí mismas. Cuanto menores sean dichas diferencias entre las mediciones efectuadas, mayor será la precisión de la determinación realizada.

Por ejemplo, suponiendo que una magnitud o cantidad es medida por quintuplicado por tres métodos diferentes, A, B y C, y los resultados se representan en la Figura A1. Se puede observar que el método A es altamente preciso y exacto, el método B es preciso pero no exacto y el método C tiene baja exactitud y baja precisión.

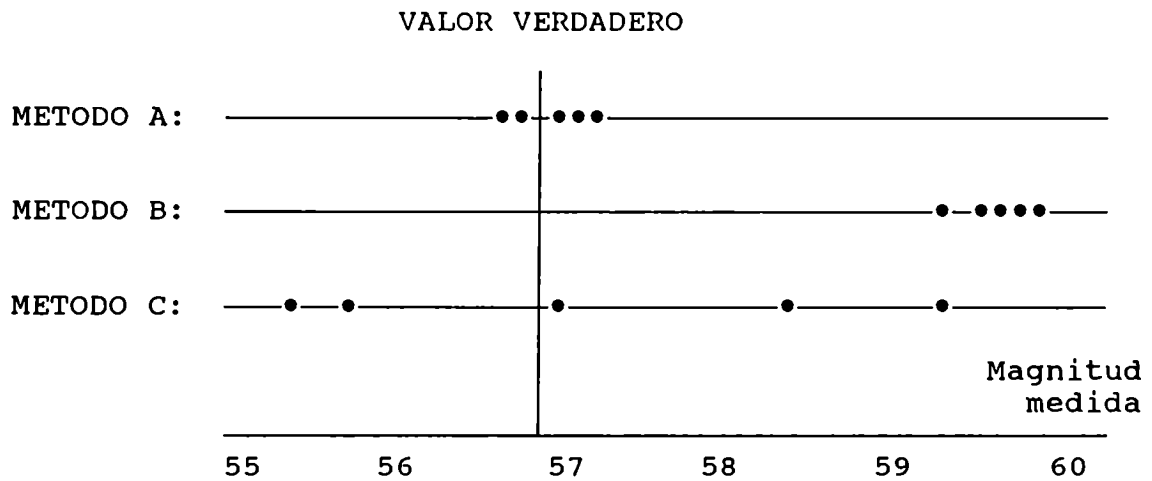


Figura A1

### A1.1.2. Error y desviación

Los términos **exactitud** y **precisión** no tienen significado cuantitativo y son utilizados en sentido descriptivo. En cambio, los términos **error** y **desviación** están cuantitativamente definidos.

Si se han efectuado  $n$  replicados o mediciones de una magnitud o cantidad  $(X_1, X_2, \dots, X_n)$ , se puede definir la **media** (promedio o media aritmética) de dichas mediciones como:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n}$$

Este conjunto de mediciones tienen dos propiedades útiles e interesantes:

1 - Para cada medición (y también para la media) hay una diferencia finita entre el valor observado ( $X_i$ ) y el valor verdadero ( $\mu$ ). Esta diferencia es llamada **error de la medición**.

$$\text{Error} = \text{valor observado } (X_i) - \text{valor verdadero } (\mu)$$

La **exactitud** de una medición está cuantitativamente expresada por el **error**, el cual es bajo cuando la exactitud es alta.

2 - Todas las mediciones efectuadas no son idénticas, pero difieren más o menos apreciablemente unas de otras y se encuentran distribuidas al azar. Cuán próximas resultan las mediciones **entre sí**, sin tener en cuenta su cercanía al valor verdadero (el cual puede o no ser conocido), es descrito por la **desviación** de un grupo de mediciones.

La **desviación** de una medición ( $x_i$ ) respecto de la media es definida como:

$$x_i = X_i - \bar{X}$$

La **desviación promedio** ( $\bar{x}$ ) de un conjunto de mediciones es el promedio de las desviaciones individuales ( $x_i$ ), sin tener en cuenta el signo que poseen:

$$\bar{x} = \frac{|x_1| + |x_2| + \dots + |x_n|}{n}$$

| |: valor absoluto.

Otras dos formas de expresar la desviación son el **rango** ( $w$ ) y la **desviación estándar** ( $s$ ). El primero indica la diferencia entre el valor más grande y el valor más pequeño medido en un conjunto de mediciones efectuadas de una misma magnitud o cantidad:

$$w = X_{\text{máximo}} - X_{\text{mínimo}}$$

La desviación estándar es matemáticamente expresada por:

$$s = \sqrt{\frac{x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2}{n - 1}}$$

donde:  $n - 1$ , son los grados de libertad.

La **precisión** de un conjunto de mediciones de una misma magnitud es cuantitativamente expresada por la **desviación promedio** ( $x$ ), el **rango** ( $w$ ) o la **desviación estándar** ( $s$ ), los que son bajos cuando la precisión es alta.

El rango se calcula rápidamente y puede ser usado para conjuntos pequeños de mediciones. Si la estimación de la precisión será usada para desarrollar tests estadísticos, la desviación estándar ( $s$ ) es la mejor medida de la desviación



por ser más eficiente que el rango ( $w$ ).

El error de una medición en general no puede ser calculado a menos que se conozca el valor verdadero, lo cual en general no ocurre. Sin embargo,  $\bar{x}$ ,  $w$  o  $s$  de un conjunto de mediciones pueden ser calculados perfectamente.

La precisión no necesariamente guarda una relación con la exactitud, aunque en algunos casos es justificable inferir alta exactitud de alta precisión.

El error y la desviación de las mediciones efectuadas están expresadas sobre bases absolutas, en las mismas unidades que las de las mediciones efectuadas. Sin embargo, a menudo es más significativo expresar error y desviación como cantidades relativas a la magnitud de la cantidad medida.

Así resulta:

$$\text{Error relativo} = \frac{\text{error}}{\text{valor verdadero}}$$

$$\text{Rango relativo} = \frac{w}{\bar{X}}$$

$$\text{Desviación estándar relativa} = \frac{s}{\bar{X}}$$

Estas cantidades relativas carecen de unidades, siendo solamente relaciones de dos cantidades medidas en iguales unidades. Multiplicándolas por 100, 1.000 ó 1.000.000, dichas cantidades relativas quedan expresadas en por ciento (%), por mil (‰) o partes por millón (ppm), respectivamente (Blaedel y Meloche, 1963).

### **A1.1.3. Información de los resultados de una medición**

Si se efectúa una serie de mediciones de una cantidad o magnitud, informar la **media** de aquéllas es más correcto que informar un resultado aislado de dicha serie, libremente elegido. Sin embargo, informar la media solamente tiene poco significado, a menos que sea acompañada por un estimador de la precisión de la medición efectuada, preferiblemente la

**desviación estándar** (s) o el **rango** (w). Finalmente, la significatividad o validez de la media depende del número de mediciones realizadas, n, el cual también debe ser informado

$$\bar{X} \pm s \quad (n)$$

Estos tres ítems constituyen la mínima información que debe ser reportada. Debe siempre aclararse a qué parámetro corresponde la expresión cuantitativa de la precisión que acompaña a la media.

#### **A1.1.4. Propósito del estudio del error**

Aunque el error nunca puede ser totalmente eliminado, el experimentador trata constantemente de reducirlo. Un estudio formal y cuantitativo del error produce principios y métodos que son muy útiles en:

- 1 - revelar fuentes del error
- 2 - testear la efectividad de un intento para reducir el error
- 3 - estimar cuán cercano cae un valor observado respecto del valor verdadero
- 4 - cálculos apropiados para la prueba estadística.

#### **A1.1.5. Tipos de error**

Los errores se clasifican en:

errores aleatorios  
errores determinados

Un **error aleatorio** es aquél que varía libremente, no reproduciblemente, de una medición a otra de una misma cantidad y dicho error no es de la misma magnitud para cualquiera de las mediciones pertenecientes a un mismo conjunto, excepto por azar, y tienen distinto signo. Se los

llama también **errores azarosos o indeterminados**.

Un **error determinado** es aquél que afecta a todas las mediciones efectuadas de una misma cantidad, con igual signo. En la figura A1, en los métodos A y C se observa que los errores cometidos en las mediciones efectuadas son azarosos o aleatorios, mientras que en el método B los errores son determinados.

En la práctica, un error real tiene un componente aleatorio y un componente determinado, es decir, contribuyen a él fuentes diferentes de error.

Por **métodos estadísticos** es posible resolver un error observado en su componente aleatoria y en aquella determinada. Esta separación ayuda a descubrir las fuentes de error y a reducirlos (Blaedel y Meloche, 1963).

#### **A1.1.5.1. Error aleatorio**

Si se efectúa un gran número de mediciones ( $n$ ) de una misma cantidad, los resultados individualmente obtenidos no son todos idénticos entre sí ni iguales al valor verdadero ( $\mu$ ), pero están aleatoriamente distribuidos a ambos lados de dicho valor, en forma azarosa. Entonces las frecuencias relativas de ocurrencia de las mediciones de distinta magnitud obtenidas se ven en la figura A2, que representa lo que se denomina **curva de distribución normal, curva de Gauss, campana de Gauss, curva de distribución gaussiana, curva de probabilidad**.

En ordenadas se representa la frecuencia con la que se repite cada medición efectuada de una misma cantidad (frecuencia relativa  $y$ , en consecuencia, probabilidad), cuya magnitud se expresa como  $X$  (en abscisas)  $y$ , por lo tanto, su error será:

$$\text{Error absoluto} = X - \mu$$

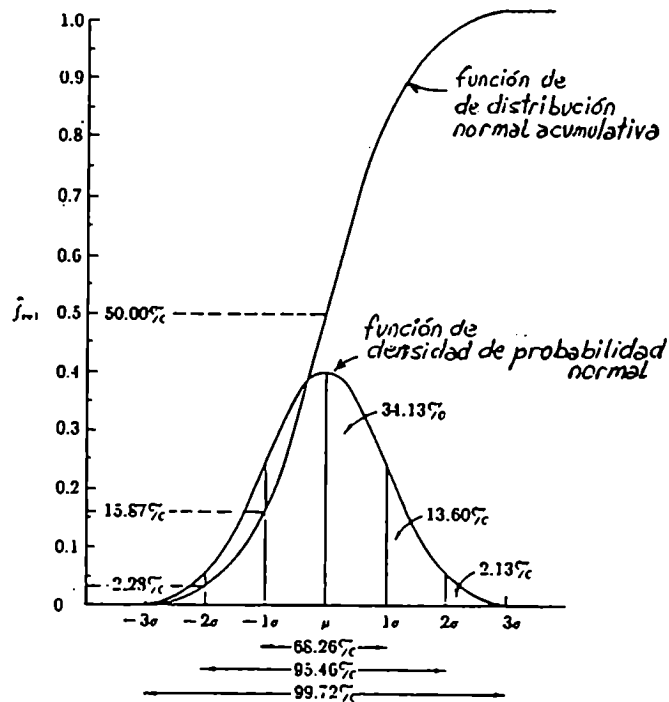


Fig. A2. Curva de distribución normal

La curva normal muestra cómo los datos obtenidos se distribuyen alrededor del valor verdadero ( $\mu$ ), y posee las siguientes propiedades:

- a - Es una curva simétrica, por lo que errores positivos y negativos son igualmente probables. Para cada error positivo en un gran número de mediciones, habrá un correspondiente error negativo de igual magnitud.
- b - Los pequeños errores ocurren mucho más frecuentemente que los grandes.
- c - La ocurrencia de un error grande es relativamente improbable.

En otras palabras, la curva normal representa el perfil de distribución que resulta de  $n$  mediciones efectuadas de una dada cantidad, cuando  $n$  es un valor grande (tendiente a infinito).

La **amplitud** de la curva indica la precisión del método de medición empleado. Un método preciso dará por resultado una curva aguda, de pendiente grande (Blaedel y Meloche, 1963).

La amplitud de la curva está determinada por la **desviación estándar**, relación que está expresada en la ecuación o función de densidad de la curva normal:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-(x-\mu)^2/2\sigma^2} \quad \forall x \in R$$

La función  $f$  es una función de densidad porque  $f(x) \geq 0$   $\forall x \in R$ , y además puede probarse que:

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(x) \cdot dx = 1$$

(Garrido y Sarchi, 1990).

En ella,  $\sigma$  es la **desviación estándar verdadera** o respecto del valor verdadero. Es el que determina justamente cuán aguda resulta la curva de distribución.

En la Figura A2 se observa que la primera abscisa representa el valor medido  $X$  de la cantidad o magnitud considerada. Si se sustrae el valor verdadero  $\mu$  de cada valor medido  $X$  (abscisa siguiente), la curva también representa la distribución de errores alrededor del valor verdadero. En la abscisa inferior, las unidades del error en vez de estas dadas en iguales unidades que  $X$ , pueden estar dadas en unidades de desviación estándar,  $(X-\mu)/\sigma$ .

Los siguientes porcentajes representan las áreas bajo la curva de distribución normal correspondientes al rango de distintos  $\sigma$ , según también se indica en la Figura A2:

$\mu \pm \sigma$	contiene 68,26% del área bajo la curva
$\mu \pm 2\sigma$	contiene 95,46% del área bajo la curva
$\mu \pm 3\sigma$	contiene 99,73% del área bajo la curva

Cuando se mide una cantidad, el objetivo primario es encontrar el valor verdadero  $\mu$ . Casi siempre, un segundo objetivo es encontrar la precisión del método de medida empleado, el cual es mejor descrito por la **desviación estándar verdadera** ( $\sigma$ ). Debido al error aleatorio, no hay seguridad que una simple medición efectuada o que la media

de unas pocas mediciones dé el verdadero valor  $\mu$ .

Tampoco existe seguridad que la desviación estándar  $S$  calculada a partir de un pequeño número de mediciones ( $n$ ) de una misma cantidad coincida con la desviación estándar verdadera  $\sigma$ .

En realidad, los valores de  $\mu$  y  $\sigma$  no pueden ser conocidos exactamente a menos que se realice un infinito número de mediciones de una dada cantidad.

En la práctica, esto no es posible y uno debe contentarse con tomar una muestra de unas pocas mediciones y con esto debe poder conocer los mejores estimadores de  $\mu$  y de  $\sigma$ .

valor verdadero  $\longrightarrow \mu$

desviación estándar verdadera  $\longrightarrow \sigma$

Estos deben distinguirse de sus estimadores,  $\bar{X}$  y  $s$  respectivamente, los que pueden ser calculados a partir de un número finito de mediciones.

$\mu \longrightarrow \bar{X}$

$\sigma \longrightarrow s$

Debido a que la curva de distribución normal es simétrica, errores positivos y negativos se producen en las mediciones individuales y tienden a cancelarse al promediarse éstas para hallar la media aritmética ( $\bar{X}$ ). Esta cancelación es más perfecta cuanto mayor es el número ( $n$ ) de mediciones efectuadas de una misma cantidad. A su vez, cuanto mayor es  $n$ , mejor estimador de  $\mu$  resulta la  $\bar{X}$  calculada. La precisión de ésta, expresada por el desvío estándar  $s$ , también aumenta al existir mayor número ( $n$ ) de mediciones efectuadas, aunque en este caso el grado con el que  $n$  influye es menor que en  $\bar{X}$  pues está afectado por una raíz cuadrada. En estas condiciones, también aumenta la bondad de  $s$  como estimador de  $\sigma$ . Típicamente, para  $n \leq 4$ ,  $s$  puede diferir varias veces de  $\sigma$ .

**En conclusión,** cuando  $\bar{X}$  y  $s$  son calculados a partir de un pequeño número ( $n$ ) de mediciones efectuadas a partir de una misma cantidad, todo lo que el operador puede afirmar con algún grado de confianza es que los valores  $\mu$  y  $\sigma$  probablemente caigan dentro de ciertos rangos alrededor de  $\bar{X}$  y  $s$ , respectivamente.

El estudio cuantitativo de los errores aleatorios es un aspecto de la estadística y debe ser hecho matemáticamente. Referente a este aspecto, es deseable llegar a calcular y conocer:

- a) Los límites de confianza de la media ( $\bar{X}$ ), es decir, definir un intervalo alrededor de la media dentro del cual uno pueda esperar (con cierto grado de confianza) que caiga el valor verdadero ( $\mu$ ).
- b) Comparación de la media ( $\bar{X}$ ) con el valor verdadero ( $\mu$ ) con el objeto de probar un método de análisis, siendo conocido el valor verdadero.
- c) Comparación de dos medias  $\bar{X}_1$  y  $\bar{X}_2$ , con el objeto de comparar un método de análisis frente a otro. El mismo tipo de prueba estadística debe hacerse cuando se desea juzgar si existe diferencia significativa entre dos materiales cuando pueden ser usados, uno en reemplazo del otro, en un dado método analítico.
- d) Comparación del desvío estándar ( $s$ ) con el desvío estándar verdadero ( $\sigma$ ) conocido. Por ejemplo, tal comparación debe ser hecha cuando el operador desea probar su propia técnica y equipamiento para un método de análisis del que se conoce su  $\sigma$ .
- e) Comparación de dos valores de desvío estándar ( $s$ ): en algunos casos es necesario decidir si una  $s_1$ ,

observado a partir de  $n_a$  determinaciones, es significativamente diferente de un  $s_b$ , observado a partir de  $n_b$  determinaciones, cuando el  $\sigma$  es desconocido en ambos conjuntos de mediciones efectuadas. Este test es llamado test de F. No es necesario que  $\bar{X}_a$  y  $\bar{X}_b$  sean iguales.

- f) Estadística simplificada para  $n \leq 10$ . La **mediana** posee dos ventajas sobre la media: primero, la mediana puede ser determinada más rápida y fácilmente que la media. Segundo, no es tan sensible a los valores de los extremos como la media. Hay a menudo una significativa posibilidad de que los valores extremos en un conjunto de mediciones (las cuales fueron previamente ordenadas en sentido ascendente de sus valores), pueda tener un error determinado, en cuyo caso la mediana puede ser usada ventajosamente.

La mediana es un estadístico menos eficiente que la media y es un estimador del valor verdadero ( $\mu$ ) con menor bondad que la media. Para  $n \leq 10$ , sin embargo, la pérdida en eficiencia es pequeña.

- g) Tratamiento de datos discordantes, es decir, resultados que difieren considerablemente de los del resto de un conjunto de mediciones efectuadas de una misma cantidad. La cuestión radica entonces en saber si aquellos resultados deben o no ser descartados.
- h) Interpretación de resultados obtenidos por grupos de personas diferentes que miden una misma cantidad. Los grupos difieren en la precisión con la cual trabajan, pudiéndose establecer cuál grupo de persona trabaja mejor.



- i) Existen otros tests que permiten comparar más de dos medias o más de dos desviaciones estándar.

#### **A1.1.5.2. Error determinado**

Cuando existe un error determinado en un conjunto de mediciones de una misma cantidad, el resultado es una diferencia significativa entre la media ( $\bar{X}$ ) de dicho conjunto y el valor verdadero ( $\mu$ ).

$$\text{Error absoluto} = \bar{X} - \mu$$

Para revelar si el error observado en un método de análisis es predominantemente determinado o aleatorio, una serie de mediciones se debe realizar por el método en cuestión sobre una muestra cuyo valor verdadero se conoce. Cuando la **diferencia** entre la media ( $\bar{X}$ ) y el valor verdadero ( $\mu$ ) es varias veces más grande que  $\bar{x}$ ,  $s$  o  $w$ , no son necesarios métodos estadísticos para decidir que el error del método es predominantemente del tipo **determinado**. Sin embargo, cuando la diferencia entre  $\bar{X}$  y  $\mu$  es del mismo orden de magnitud que  $\bar{x}$ ,  $s$  o  $w$ , tests estadísticos cuantitativos deben aplicarse para decidir si el error determinado es significativo.

**Existen clases diferentes de errores determinados:**

- a) **Error sistemático:** se produce siempre en una misma dirección, pero no es reproducible en magnitud y puede variar de una determinación a otra.
- b) **Error constante:** es aquel error determinado cuya magnitud absoluta es constante y reproducible de una a otra determinación. Tales errores son bastante comunes (error por la concentración de un determinado reactivo del que se usa un volumen definido, por ejemplo).

- c) **Error proporcional:** es aquel error determinado cuyo valor absoluto es proporcional a la cantidad del constituyente buscado (error en la concentración del reactivo valorante usado en una volumetría o por cálculos gravimétricos basados en un factor gravimétrico incorrecto).

Después que se ha observado la existencia de un error, se intenta siempre **reducirlo**. Para hacerlo, se debe primero encontrar el grado de componente aleatorio y determinado que tiene el error que se produce y, en el caso de este último tipo, identificar si es sistemático, constante o proporcional. Existen recursos para identificar las fuentes de error al aplicar un método de análisis. Resulta útil, por ejemplo, determinar cómo el error varía con el tamaño de la muestra y con las condiciones experimentales. A menudo, ajustando y perfeccionando las condiciones experimentales, calidad de reactivos usados, etc., se reduce en grado suficiente el error resultante. El error aleatorio o el componente aleatorio del error puede disminuirse aumentando el número de determinaciones que se efectúan, lo cual a menudo **no** es posible, especialmente en el análisis químico, debido a la demora que se produciría en el análisis y al encarecimiento considerable del mismo. Problemas de tiempo-costos son muy a menudo, insalvables. En general, no es posible realizar cuatro o más determinaciones en el análisis químico de rutina.

La **clasificación del error** de acuerdo a la fuente resulta útil también para discriminar el tipo de error producido. En el análisis químico hay tres tipos principales de fuentes de error:

- a) Errores debidos a la inexperiencia y/o al descuido del operador.
- b) Errores debidos a las facilidades disponibles para realizar el trabajo en cuestión, tales como equipamiento, disponibilidad de reactivos, planta o espacio físico en sí en el cual se trabaja.

- c) **Error inherente al método**, el cual no puede evitarse pero sí debe ser mantenido bajo, dentro de ciertos límites. Así resultará un **error estándar** esperado de un operador o analista **experimentado**, trabajando con buenas facilidades. El error inherente al método puede ser seriamente agravado por un operador inexperto o descuidado y/o por inadecuado espacio de trabajo.

La selección de condiciones experimentales para reducir un error determinado es el método más deseable. Otro procedimiento consiste en permitir que el error determinado ocurra, pero bajo condiciones controladas, de tal manera que sea tan pequeño y reproducible como sea posible. Con un control adecuado, se puede aplicar una corrección adecuada al resultado, o bien la determinación puede ser llevada a cabo de tal forma que el error se vea compensado.

Algunos de los **métodos** más conocidos y usados para **corregir o compensar el error determinado** en el análisis químico son: cálculo teórico de correcciones (factores de corrección, etc.), correcciones por calibración del material volumétrico y/o de los elementos utilizados en las pesadas, correcciones por error constante, reproducible e independiente de la cantidad de constituyente buscado (el blanco), corrección por error proporcional (el control).

En la práctica, un **error determinado** raramente es puramente constante o puramente proporcional, pero usualmente es una mezcla de ambos. En tales casos, **no** pueden usarse las determinaciones "blanco" ni "control" como correcciones. Una alternativa es emplear la determinación "control", pero agregándole la restricción que el **tamaño** de muestra elegido para ser analizado sea tal que contenga la misma cantidad del constituyente buscado que el control (o viceversa).

En otras oportunidades, corriendo muestras **conocidas** de diferentes tamaños, se encuentra el error como función del tamaño de la muestra. Graficando las correcciones como una función de los resultados obtenidos, se puede obtener una

función de la cual se pueda calcular qué corrección se aplica según la cantidad de constituyente obtenido para un tamaño dado de muestra analizado.

**A1.1.6. Prueba de la exactitud de los procedimientos analíticos empleados y de los resultados obtenidos**

Aún cuando el método analítico empleado, así como el desempeño del operador y el equipamiento empleado sean inobjetables, es conveniente verificar periódicamente los resultados obtenidos para detectar cualquier descuido o "deterioro" producido, ya sea tanto en la disciplina de trabajo como en el estado del equipamiento empleado. También, si se ensaya una nueva técnica analítica o si se aplican cambios en el procedimiento analítico que se viene usando o en algún equipo utilizado habitualmente, **deberá siempre probarse la exactitud** de los resultados obtenidos. Para ello puede optarse por uno de los siguientes métodos:

- a) Uso de otro método independiente de análisis o "método de referencia" para comparar.
- b) Uso de "muestras estándar" o de los llamados "patrones de referencia".
- c) Alcanzar una precisión aceptable: habiendo establecido que el error determinado está ausente, el desvío estándar  $s$  puede ser tomado como una medida del error aleatorio de un conjunto de mediciones efectuadas de una misma cantidad. En el análisis de rutina efectuado por un operador capacitado y con equipamiento adecuado, la excelente precisión que puede obtenerse se la utiliza a menudo como criterio de exactitud, lo cual no es real.

- d) Alcanzar un adecuado balance global: si por ejemplo se determinan los distintos constituyentes de una muestra de tal forma que la suma de ellos debe ser 100%, esto daría una pauta de la exactitud de los resultados parciales obtenidos (Blaedel y Meloche, 1963).

#### A1.1.7. Evaluación estadística de la técnica de determinación cuantitativa de vitamina C

A fin de evaluar objetivamente la técnica utilizada para medir el contenido de AAs y de vitamina C en los sistemas modelo, se calculó el coeficiente de variación y la recuperación del AAs en los sistemas cuya composición figura en la Tabla A1.

**Tabla A1. Composición de los sistemas modelo usados**

	I	II	III
Glucosa (%p/p)	36,0	36,0	36,0
Lisina (%p/p)	1,732	--	--
Agua csp	100,0	100,0	100,0
NaHSO <sub>3</sub> (ppm)	--	150	--
Acido L-ascórbico (%p/p)	0,035	0,035	0,035
Sorbato de potasio (ppm)	1000	1000	1000
Fe <sup>2+</sup> (ppm)	--	10	--
Cu <sup>2+</sup> (ppm)		--	10

El sistema modelo I se preparó con la composición indicada, pero sin el agregado inicial de AAs. En estas condiciones se envasó sin dejar espacio de cabeza y se almacenó a 90°C hasta aparición de un alto grado de pardeamiento (0% de transmitancia medida a 420 nm) a las 13,2 horas. En ese momento, y luego de enfriarlo hasta alcanzar

la temperatura ambiente, se agregó AAs en la concentración indicada en la Tabla A1 y se lo evaluó, obteniéndose los resultados indicados en la Tabla A2. Este procedimiento permitió conocer la efectividad del blanco de formaldehído en el bloqueo de reductonas.

Los sistemas II y III se prepararon tal cual se indica en la tabla A1 y luego se midió el contenido de AAs, obteniéndose los resultados indicados en la Tabla A2.

**Tabla A2. Análisis estadístico del método**

Sistema	$\mu$ (mg %g)	$\bar{X}$ (mg %g)	Recuperación (%)	n	S (mg %g)	CV (%)	t,
II	35,00	34,78	99,37	10	0,872	2,509	0,7973
III	35,00	34,26	97,89	10	1,083	3,162	2,1603
I	24,94	25,71	103,09	10	1,314	5,112	1,8528

La preparación del sistema II permitió también evaluar la concentración de la solución de agua oxigenada mínima necesaria para poder bloquear la acción reductora y potencialmente interferente de los iones metálicos y del bisulfito de sodio presentes. El sistema III se preparó para comprobar la posible interferencia del Cu(II) en la técnica.

Según se ve en los resultados indicados en la Tabla A2, la precisión es buena (coeficiente de variación menor al 10%) y se observan buenas recuperaciones. Un test de hipótesis (Sokal y Rohlf, 1980) no muestra diferencias significativas (a un nivel de significatividad de 0,05) entre  $\mu$  (AAs agregado) y la  $\bar{X}$  (AAs determinado). La prueba se basa en la comparación de la media ( $\bar{X}$ ) de una muestra con el valor verdadero, que en este caso es conocido. Como se trata de muestras pequeñas, entonces se hizo un test de t (de Student).

Las ecuaciones consideradas fueron las siguientes:

$$\begin{aligned} \text{Desvío} &= |\bar{X} - \mu| \\ s &= \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n-1}} \\ \text{CV} &= \frac{100 \cdot s}{\bar{X}} \\ t_s &= \frac{|\bar{X} - \mu|}{s/\sqrt{n-1}} \end{aligned}$$

donde:

- s, desvío estándar
- CV, coeficiente de variación de Pearson, que es el desvío estándar expresado en centésimos de la media
- n, número de observaciones
- n-1, grados de libertad
- t<sub>s</sub>, es el t calculado.

El t calculado debe compararse con el t de la tabla de Gosset-Student para n-1 grados de libertad y con el grado de significatividad buscado, para decidir si el desvío respecto del valor absoluto es o no significativo. En este caso:

$$t_{\alpha; (n-1)} = t_{0,05;9} = 2,262$$

Si la diferencia entre  $\bar{X}$  y  $\mu$  (en valor absoluto) no es más grande que el intervalo de confianza  $t \cdot s/\sqrt{n}$  o bien, si el t calculado (t<sub>s</sub>) es menor que el t de tablas correspondiente, puede concluirse que no hay diferencia significativa entre la media muestral (X) (ácido L-ascórbico determinado) y el valor verdadero ( $\mu$ ) (ácido L-ascórbico agregado).

En cambio, la diferencia entre la media,  $\bar{X}$ , y el valor verdadero,  $\mu$ , es significativamente diferente cuando ocurre lo contrario.

Con los resultados citados en la Tabla A2 no hubo diferencia significativa entre el AAs agregado y el AAs determinado.

El porcentaje de recuperación se determina, como es de esperar, de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{AAs determinado} \cdot 100}{\text{AAs agregado}}$$

## A1.2. REGRESION

Frecuentemente se miden dos o más variables y consecuente-mente sería útil conocer con mayor precisión la naturaleza de la **relación** entre dichas variables. Así se tiene la **regresión** y la **correlación**. En la **regresión** se estima la relación de una variable con otra, expresándola en términos de una función lineal de la otra. En un problema de **regresión** se tiene entonces una variable independiente, que llamaremos X, cuyos valores los fija el experimentador al diseñar la experiencia, y una variable aleatoria Y, tal que  $Y = f(X)$ .

A qué se denomina **variable aleatoria**: si S es el espacio de resultados de un experimento aleatorio, una variable aleatoria es una función tal que a cada elemento de S le hace corresponder un número real. Las variables involucradas en regresión y correlación son continuas (Garrido y Sarchi, 1990).

Si ambas variables, X e Y, son aleatorias e interesa conocer el **grado de asociación** lineal que hay entre ellas, sin distinguir cuál es la variable independiente y cuál es la dependiente, debe plantearse un problema de **correlación** (Garrido y Sarchi, 1990). Se determina así en qué grado dos variables varían juntas (Sokal y Rohlf, 1969). Por ejemplo, puede interesar estudiar la relación entre peso y altura de una población humana.

La **ecuación de regresión** puede representarse por:

$$Y = a + bX$$

donde

la pendiente b, en biometría también es llamada **coeficiente de regresión**.



$$b = \frac{dY}{dX}$$

Como el coeficiente de regresión  $b$  resulta de la variable  $Y$  sobre la variable independiente  $X$ , se acostumbra escribir  $b_{Y,X}$  (Sokal y Rohlf, 1969).

#### A1.2.1. Modelos en regresión

Las observaciones reales no caen o no alínean a lo largo de la recta de regresión debido al error aleatorio de las mediciones y debido a los efectos impredecibles de factores ambientales. En la regresión, una relación funcional no significa que para un dado  $X$  el valor de  $Y$  deba ser  $a + bX$ , sino más bien que la **media** (o valor esperado) de  $Y$  es  $a + bX$ .

Los tests de significatividad de la regresión están basados sobre los dos modelos siguientes. El más común de ellos, el **modelo I de regresión**, es especialmente adecuado en situaciones experimentales en general. Este modelo está basado en cuatro suposiciones:

- 1 - La variable independiente  $X$  es mensurada **sin error**. Por ello, se dice que  $X$  es fijada a priori por el operador. Con esto se da a entender que sólo  $Y$ , la variable dependiente, es una variable aleatoria.  $X$  no varía aleatoriamente, está bajo el control del investigador (Sokal y Rohlf, 1969).
- 2 - El valor esperado de la variable aleatoria  $Y$  para cualquier dado valor de  $X$  está descrito por la función lineal  $\mu_Y = \alpha + \beta X$ . Esta es la misma relación que se ha encontrado antes, pero se usan letras griegas para  $a$  y  $b$  ya que se está describiendo una relación paramétrica. Esta relación significa que  $\mu_Y$  de los valores de  $Y$  son una función de  $X$  y cae sobre la línea recta descrita por esta ecuación.

- 3 - Para un dado valor de X, los Y's correspondientes están independiente y normalmente distribuidos. Esto puede ser representado por la ecuación  $Y = \alpha + \beta X + \epsilon$ , donde  $\epsilon$  es una variable aleatoria que representa el error que se comete al aproximar f por g. Este error está normalmente distribuido, con una media de cero. La Figura A3 ilustra este concepto.

$$Y = f(x) \quad \text{(Item 1)}$$
$$Y = g(x) + \epsilon \quad \text{(Items 2 y 3)}$$

donde:  $g(x) = \alpha + \beta X$ .

En la expresión de "g" intervendrán ciertas constantes o parámetros que no se conocen, y que habrá que estimar a partir de una muestra.

$Y = g(x) + \epsilon$  será la ecuación de regresión o modelo de regresión a ajustar.

Ajustar el modelo significa encontrar, a partir de los valores observados, los mejores estimadores de los parámetros de la ecuación de regresión. Por ejemplo, si la función g se puede representar por medio de una recta, habrá que estimar dos parámetros: la pendiente y la ordenada al origen. El modelo a ajustar será:

$$Y = \alpha + \beta.X + \epsilon$$

Calculando los **estimadores** de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  se obtendrá la ecuación de regresión estimada. Usando esta ecuación, para un valor dado de X puede estimarse la media de Y (Garrido y Sarchi, 1990).

En la figura A3 se ve que existe una frecuencia de distribución de valores de Y (presión sanguínea) alrededor del valor esperado para una dada concentración de la droga en sangre. Dichos valores estarían independiente y normalmente distribuidos. Esto se ve indicado por las curvas normales.

No todo experimento tendrá más de un replicado de Y por

cada valor de X. Existe el caso de regresión donde por cada valor de X existe un valor medido de Y, y otro caso en el que hay más de un valor medido de Y por cada valor de X.

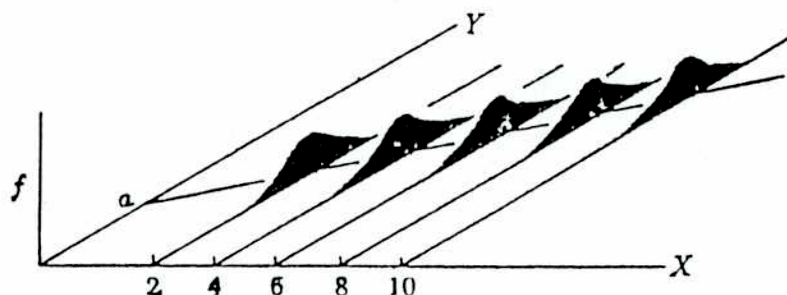


Fig. A3. Presión sanguínea, en mmHg, de un animal como una función de la concentración de droga ensayada, en  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de sangre. Repetido muestreo de una dada concentración de droga (Sokal y Rohlf, 1969).

- 4 - La suposición final es que las mediciones a lo largo de la recta de regresión tienen una varianza ( $\sigma^2$ ) común, la cual es la varianza de las  $\epsilon$ 's en la expresión vista arriba. Se asume que la varianza alrededor de la línea de regresión es constante e independiente de la magnitud de X e Y.

El **modelo II de regresión** considera que la variable independiente está también medida con error, es decir, es también una variable aleatoria.

Para el presente trabajo se aplicó el **modelo I de regresión**, donde la variable independiente X (**tiempo** al cual se midió una concentración o una absorbancia, o **temperatura** a la cual se determinó una constante de velocidad de reacción) es medida sin error o fue fijada a priori en el diseño de la experiencia. Además se consideró en consecuencia que se cumplen las cuatro suposiciones correspondientes.

### A1.2.2. Aplicación del modelo I de regresión

Como ya fuera explicado en "Materiales y Métodos", ítem 3.2, se almacenó a una temperatura determinada cada sistema modelo, el cual una vez preparado fue fraccionado en diferentes tubos o frascos de vidrio. A tiempos preestablecidos fueron retirados de la estufa dos frasquitos, en cada uno de los cuales se determinó la concentración de AAs alcanzada. Así, a cada tiempo de almacenamiento se contó con dos datos de concentración de AAs a una dada temperatura y con dos datos de absorbancia del sistema, medidos a 420 nm de longitud de onda.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ajustan a un modelo I de regresión en el cual el tiempo, o la inversa de la temperatura, constituye la variable independiente X, mientras que la concentración de AAs, o la absorbancia, o la constante cinética (en el modelo de Arrhenius) constituye la variable dependiente Y.

Los datos, tal cual son obtenidos, no siempre ajustan a la linealidad. Muy a menudo es necesario aplicar una transformación de aquéllos. Una prueba general de si tal transformación mejorará el ajuste a la linealidad, consiste en graficar los puntos a ser ensayados sobre papel milimetrado o sobre otro cuya escala se cree o se sospecha sea la adecuada para mejorar tal relación. Si así la relación lineal mejora y la desviación de los puntos alrededor de la línea virtualmente ajustada es reducida, la transformación de los datos será válida (Sokal y Rohlf, 1969).

La **transformación logarítmica** es la más frecuentemente usada. La más frecuentemente transformada es la variable Y. Tal relación es indicada por la ecuación:

$$Y = a e^{bx}$$

donde **a** y **b** son constantes y **e** es la base del logaritmo natural. Después de la transformación resulta:

$$\ln \hat{Y} = \ln a + b (\ln e) X$$

En esta expresión  $\ln e$  es una constante, la que multiplicada por  $b$  origina un nuevo factor  $b'$ , el cual es equivalente al coeficiente de regresión. Igualmente,  $\ln a$  es una nueva intercepción en  $Y$ ,  $a'$ . Se podrá entonces simplemente regresionar  $\ln Y$  (o  $\hat{Y}^*$ ) en  $X$  para obtener la función:

$$\hat{Y}^* = a' + b' X$$

y obtener todas nuestras ecuaciones de predicción e intervalos de confianza en esta forma.

El propósito del análisis es establecer si la relación entre el tiempo y la concentración (o el logaritmo natural de la concentración) del AAs puede ser adecuadamente descrita por una regresión lineal de la forma general:

$$Y = a + bX$$

ó  $\ln \hat{Y} = a' + b'X$

A menos que las observaciones reales caigan exactamente sobre una línea recta, se necesitará un criterio para determinar cuál es la línea que mejor ajusta a los datos con los que se cuenta. En estadística generalmente se ha seguido el principio de los **mínimos cuadrados**.

Suponiendo que se tuviese la distribución de puntos experimentales indicados en la Fig. A4, se señalan las medias aritméticas de los datos en  $Y$  ( $\bar{Y}$ ) y de los datos en  $X$  ( $\bar{X}$ ).

Si se dibuja una línea paralela al eje  $X$  y que pase por la media  $\bar{Y}$ , entonces las desviaciones de dicha línea (paralelas al eje  $Y$ ) representarían las desviaciones de las observaciones respecto de la media  $\bar{Y}$  (variable  $Y$ ) (Figura A5).

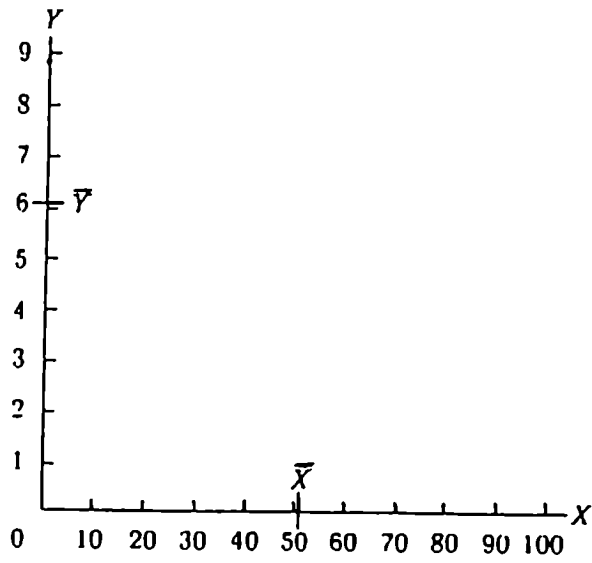


Fig. A4. Puntos experimentales.

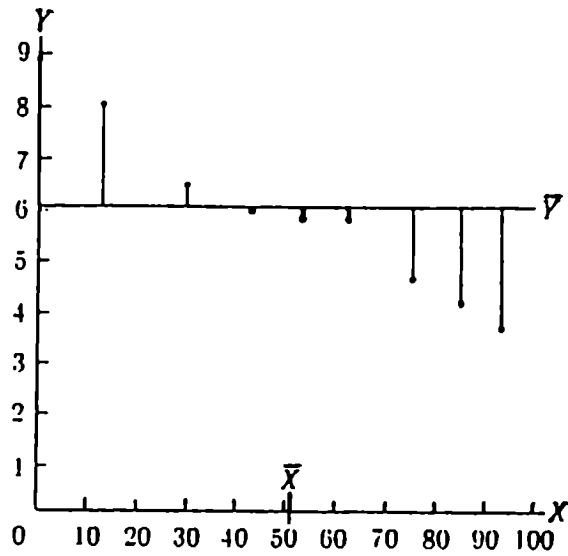


Figura A5

La suma de estas observaciones,  $\Sigma(Y-\bar{Y}) = \Sigma y = 0$ , y la suma de los cuadrados,  $\Sigma(Y-\bar{Y})^2 = \Sigma y^2$ , es menor que aquélla respecto de cualquier otra línea horizontal. En otras palabras, la media aritmética de Y representa la línea

horizontal de mínimos cuadrados (le corresponde un mínimo). Cualquier línea horizontal dibujada a través de los datos en un punto diferente de la media  $Y$  produciría una suma de desviaciones diferente de cero y una suma de desviaciones al cuadrado más grande que  $\Sigma y^2$ .

Una línea de regresión que pasa a través de las observaciones o de los datos desde luego no será necesariamente una horizontal, sino que tendrá una pendiente. Esta recta indicará que para cada valor de la variable independiente  $X_i$  existirá un valor **estimado** de la variable dependiente. Debe distinguirse entre el valor estimado de  $Y_i$ , al cual se lo designa como  $\hat{Y}_i$ , y el valor observado o dato medido, al cual se lo simboliza como  $Y_i$ . La ecuación de regresión se escribirá así:

$$\hat{Y} = a' + b'X$$

la cual expresa que para valores dados de  $X$ , la ecuación calcula los valores de **Y estimados** ( $\hat{Y}$ ). La desviación de una observación  $Y_i$  respecto de la línea de regresión es  $(Y_i - \hat{Y}_i)$  y es generalmente simbolizada  $d_{y_x}$ . Estas desviaciones pueden ser aún dibujadas paralelas al eje  $Y$ , pero dado que la regresión lineal en cuestión es inclinada, aquéllas caerán sobre la recta inclinada, tal como se observa en la Figura A6. La suma de estas desviaciones es nuevamente cero ( $\Sigma d_{y_x} = 0$ ), y la suma de sus cuadrados da una magnitud  $\Sigma (Y - \hat{Y})^2 = \Sigma d_{y_x}^2$  análoga a la suma de cuadrados  $\Sigma y^2$ . La expresión  $\Sigma d_{y_x}^2$  es llamada la **suma de cuadrados dentro** (o inexplicado). La línea resultante de la regresión lineal por mínimos cuadrados, que pasa a través de un conjunto de puntos, es definida como aquélla que resulta de  $\Sigma d_{y_x}^2$  en un mínimo. Sería, geoméricamente hablando, aquella línea que está lo más cercana posible a cuanto punto (observación  $X_i; Y_i$ ) sea posible. La consecuencia de estos criterios es que la línea ajustada **debe pasar a través del punto**  $(\bar{X}; \bar{Y})$ .

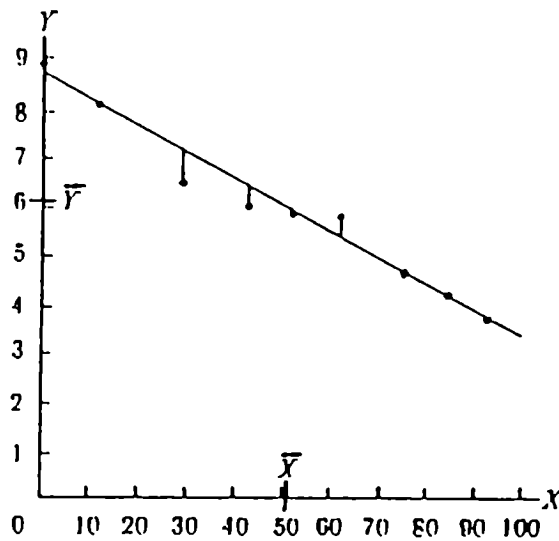


Figura A6

Entonces se podría calcular la pendiente de regresión correcta, aunque sería impracticable, pivoteando una regla sobre el punto  $(\bar{X}; \bar{Y})$ , y calculando la suma de cuadrados "dentro",  $\sum d_{yx}^2$ , por cada una de las innumerables posiciones posibles. Aquélla que da el mínimo valor de  $\sum d_{yx}^2$  sería la línea de regresión de mínimos cuadrados. Para el desarrollo de la fórmula de la pendiente correspondiente a dicha línea se deben efectuar una serie de cálculos.

Para determinar la ecuación de regresión lineal con las características que fueran ya indicadas previamente, se debieron efectuar los siguientes cálculos mediante la utilización de planilla de cálculo, según fuera indicado en el ítem 3.5:

- 1)  $n$  : tamaño de la muestra o número de pares X;Y  
 $\sum X$  ;  $\sum Y$  : suma de las observaciones  
 $\sum X^2$  ;  $\sum Y^2$  : sumas de las observaciones al cuadrado  
 $\sum XY$  : suma de los productos X·Y.



- 2)  $\bar{X}$  ;  $\bar{Y}$  : medias de las observaciones  
 $\Sigma x^2$  ;  $\Sigma y^2$  : sumas de los cuadrados de los desvíos  
 donde:  $x = X - \bar{X}$   
 $y = Y - \bar{Y}$   
 $\Sigma xy$  : suma de productos

$$\Sigma_{xy} = \Sigma_{XY} - \frac{(\Sigma X)(\Sigma Y)}{n}$$

- 3) El coeficiente de regresión (pendiente estimada) es, como ya fuera indicado:

$$b_{x \cdot y} = \frac{\Sigma xy}{\Sigma x^2}$$

- 4) La ordenada al origen (a) estimada se calcula, según ya fuera visto, como:

$$\hat{Y} = a' + b'X$$

$$\bar{Y} = a' + b'\bar{X}$$

$$a' = \bar{Y} - b_{y \cdot x} \cdot \bar{X}$$

(Sokal y Rohlf, 1969).

### A1.2.3. Test de significatividad de la regresión

Es el que puede aplicarse cuando se cuenta con un solo valor de Y por cada valor de X o bien, con menos de tres valores Y por cada valor X, según ya fuera convenientemente explicado.

La prueba es de hipótesis nula donde:

$$H_0) \beta = 0$$

$$H_1) \beta \neq 0$$

En otras palabras, rechazar la hipótesis nula implicará decir que la recta de regresión estimada tiene pendiente significativamente diferente de cero. La prueba que se efectúa se fundamenta en el análisis de varianza (ANOVA).

Este se efectúa como una suma de cuadrados, según se indica en el siguiente cuadro:

Fuente de variación	gl	SC	CM	F
$\hat{Y} - \bar{Y}$ Regresión (o explicado)	1	$\Sigma \hat{y}^2 = \frac{(\Sigma xy)^2}{\Sigma x^2}$	$s_{\hat{Y}}^2$	$\frac{CM_{reg}}{CM_D}$
$Y - \hat{Y}$ Dentro (o inexplicado)	$n - 1$	$\Sigma d_{Y.X}^2 = \Sigma y^2 - \Sigma \hat{y}^2$	$s_{Y.X}^2$	
$Y - \bar{Y}$ Total	$n - 1$	$\Sigma y^2 = \Sigma Y^2 - \frac{(\Sigma Y)^2}{n}$	$s_Y^2$	

donde: SC: suma de cuadrados.

CM: cuadrado medio. Se denomina así al cociente entre una suma de cuadrados y sus correspondientes grados de libertad. Lo indicaremos como CM, o sea:

$$CM = \frac{SC}{gl} \quad (\text{Garrido y Sarchi, 1990})$$

$$CM_D = \frac{SC_D}{n-1}$$

El cuadrado medio debido a la regresión lineal ( $CM_{reg}$ ) mide la magnitud de variación en Y ocurrido o debido a la variación de X. Este cuadrado medio está basado en un grado de libertad. El cuadrado medio dentro (o no explicado) mide la variación residual.

El test de significatividad es  $F = s_{\hat{Y}}^2 / s_{Y.X}^2$ . Si el valor de  $F = s_{\hat{Y}}^2 / s_{Y.X}^2$  es mayor o igual que  $F_{0,05;1;n-1}$  (obtenido de la tabla de F de Fisher con un nivel de significación de 0,05), una grande y significativa porción de la varianza de Y ha sido explicada por regresión sobre X.



Para cada una de estas desviaciones se puede computar una correspondiente suma de cuadrados:

$$\Sigma d_{Y.X}^2 = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma xy)^2}{\Sigma x^2}$$

#### A1.2.4. Cálculo del error estándar del coeficiente de regresión

Ya se observó cómo se determinaba o se podían conocer los siguientes datos:

n

$\bar{X}$      $\bar{Y}$

$b_{Y.X}$  = coeficiente de regresión o pendiente estimada de la recta de regresión.

$\Sigma x^2$  = suma del cuadrado de los desvíos de X respecto de su media ( $\bar{X}$ ).

$$CM_D = s_{Y.X}^2 = \frac{\Sigma d_{Y.X}^2}{n - 2} = \text{cuadrado medio "dentro"}$$

El **error estándar** del coeficiente de regresión ( $s_b$ ) se calcula de la siguiente manera:

$$s_b = \sqrt{\frac{s_{Y.X}^2}{\Sigma x^2}}$$

Para determinar el intervalo de confianza (IC) del coeficiente de regresión, con un 95% de probabilidad de encontrar al valor verdadero dentro de dicho intervalo, se procedió de la siguiente forma:

$$IC = t_{\alpha; (n-2)} \cdot s_b$$

$$\text{coeficiente de regresión: } b_{Y.X} \pm (t_{0.05; (n-2)} \cdot s_b)$$

¿Qué significa determinar los límites o el intervalo de

confianza del coeficiente de regresión o pendiente estimada? Tanto la recta de regresión como los límites o intervalo de confianza pasan a través de las medias de X e Y, como se observa en la Figura A8. La variación de  $b_{Y.X}$  según su intervalo de confianza, significa que la línea de regresión rota o pivotea sobre el punto  $\bar{X}; \bar{Y}$ .

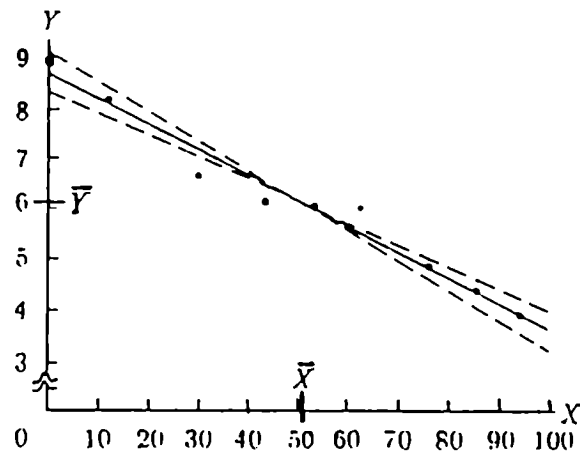


Figura A8

**A1.2.5. Cálculo del error estándar de la ordenada al origen estimada**

La determinación de los límites de confianza de "a" son un caso especial de aquél correspondiente al de un estimado  $\hat{Y}_i$ , pero a  $X_i = 0$ :

Error estándar de un  $\hat{Y}$  para un dado valor de  $X_i$  se simboliza  $s_{\hat{y}}$  y se calcula:

$$s_{\hat{y}} = \sqrt{s_{Y.X}^2 \left[ \frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{\sum X^2} \right]}$$

Y el intervalo de confianza con un 95% de probabilidad, para la ordenada al origen estimada (a), será:

$$IC = t_{\alpha; (n-2)} \cdot S_{\hat{y}}$$

ordenada al origen:  $a \pm (t_{\alpha; (n-2)} \cdot S_{\hat{y}})$ .

Los límites de confianza (o intervalos) de valores estimados  $\hat{Y}$  para cualquier dado valor  $X_i$  se calcula de igual manera. Graficándolos se obtiene la banda indicada en la Figura A9, donde el intervalo más pequeño o más angosto corresponde al punto  $\bar{X}; \bar{Y}$ .

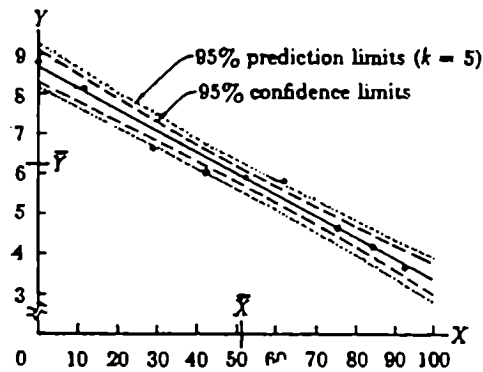


Figura A9

#### A1.2.6. Comparación de líneas de regresión

A menudo se obtienen dos o más líneas de regresión a partir de datos similares y se desea conocer entonces si las relaciones funcionales descritas por las ecuaciones de regresión son las mismas. Por ejemplo, si hay "a" muestras representando los grupos de tratamiento y el control. En análisis previos se encuentra solamente una variable, Y. Sin embargo, en un tratamiento dado, por cada observación Y existe una lectura de X. De esta manera son posibles dos análisis de varianza, uno por cada variable, y también

haciendo un análisis conjunto, la covarianza entre X e Y. Tal análisis, en su forma completa o global, recibe el nombre de "análisis de covarianza" (ANACOVA). El mismo prueba si las pendientes de varias regresiones lineales provienen de poblaciones con la misma pendiente común. Prueba si las medias de las variables dependientes son significativamente diferentes entre grupos y si esto es debido a diferencias en las variables independientes, entre grupos. Un análisis de covarianza ajusta una línea de regresión común a las medias de Y de grupos, y prueba si existe heterogeneidad significativa entre dichas medias alrededor de tal línea de regresión. Finalmente, compara esta regresión con un pool de regresiones de todos los Y's versus X's.

Las pendientes obtenidas a partir de los resultados del presente trabajo fueron sometidas a un "análisis de covarianza" con el objeto de probar dos o más líneas de regresión por homogeneidad de pendientes. Se compararon así, por ejemplo, las pendientes (velocidad de destrucción del AAs) de aquellos sistemas modelo deseados:

	Sistema Modelo A (pH 3,5)	Sistema Modelo B (pH 4,1)	Sistema Modelo C (pH 5,0)
	$X_1$	$Y_1$	$X_1$
	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
	$X_n$	$Y_n$	$X_n$
	$x$	$y$	$x$
	$y$	$x^2$	$y$
	$x^2$	$x \cdot y$	$x^2$
	$x \cdot y$	$y^2$	$x \cdot y$
	$y^2$	$\hat{Y}$	$y^2$
	$\hat{Y}$	$d_{Y.X}$	$\hat{Y}$
	$d_{Y.X}$	$d_{Y.X}^2$	$d_{Y.X}$
	$d_{Y.X}^2$	$\hat{y}$	$d_{Y.X}^2$
	$\hat{y}$	$\hat{y}^2$	$\hat{y}$
	$\hat{y}^2$		$\hat{y}^2$
Pendiente:	$b_{Y.X}$	$b_{Y.X}$	$b_{Y.X}$
Ordenada al origen:	$a$	$a$	$a$

Es decir, cada sistema a comparar tuvo su análisis previo de regresión. Una vez establecido *a priori* que los resultados obtenidos para cada sistema ajustan a una regresión lineal, según fuera visto en el ítem A1.2, se procede a someter a un ANACOVA las pendientes estimadas ( $b_{Y.X}$ ), o coeficientes de regresión.

Para probar por igualdad entre  $k$  coeficientes de regresión se necesita una **suma de cuadrados entre coeficientes de regresión**, el cual se obtiene según la siguiente fórmula:

$$SC_{\text{entre } b's} = \sum [\sum x^2 (b - \bar{b})^2]$$

donde:  $k$  = número de coeficientes de regresión comparados.

$b$  = es la pendiente común.

$$\bar{b} = \frac{\sum (b \sum x^2)}{\sum (\sum x^2)} = \frac{\sum (\sum xy)}{\sum (\sum x^2)}$$

Otra forma de expresar los mismos parámetros son:

$$SC_{\text{entre } b's} = \sum (\sum y^2) - \sum y_{\text{común}}^2$$

donde:

$$\sum y_{\text{común}}^2 = \frac{(\sum \sum xy)^2}{\sum \sum x^2}$$

La suma de cuadrados entre  $b$ 's (SC) tiene  $k-1$  grados de libertad.

Se pueden mostrar los resultados en la forma de una tabla de ANOVA:



Fuente de variación	$gl$	SC	CM	F
Entre b's (variación entre regresiones)	$k - 1$	$SC_{\text{entre b's}}$	$\frac{SC_{\text{entre b's}}}{gl}$	$\frac{CM_{\text{entre b's}}}{\bar{s}_{Y.X}^2}$
Promedio pesado de los desvíos respecto de la regresión (variación promedio dentro de las regresiones)	$\sum^k a - 2k$	$\sum^k \sum d_{Y.X}^2$	$\bar{s}_{Y.X}^2$	

$$\bar{s}_{Y.X}^2 = \frac{\sum^k \sum d_{Y.X}^2}{(\sum^k a - 2k)}$$

$a$  = número de pares X;Y en cada sistema modelo comparado.

Se pueden probar todas las combinaciones de b's y por comparación de las sumas de cuadrados para los conjuntos considerados con la suma de cuadrados crítica, se pueden tomar decisiones acerca de la significatividad de cada comparación. Como la probabilidad de cometer cualquier error de tipo I es  $\alpha$ , se hace entonces un **test de comparación simultánea**.

Ahora debe procederse a calcular la suma de cuadrados entre b's de cada conjunto de sistemas cuyas pendientes estimadas desean compararse.

$$\bar{s}_{Y.X}^2 = \frac{\sum^k \sum d_{Y.X}^2}{(\sum^k a - 2k)}$$

$a$  = nº de pares X;Y en cada sistema modelo.

Si el F calculado (Fs) resulta ser mayor o igual que el F de tablas, implica que los grupos de datos o sistemas comparados no fueron muestreados de poblaciones con iguales pendientes.

$$F_s \geq F_{\alpha; (v_1; v_2)}$$

donde:  $v_1 = k-1$

$$v_2 = \sum^k a - 2k$$

Aplicar un test de comparación simultánea entre  $k$  coeficientes de regresión, para analizar sus diferencias por significatividad puede ser hecho también en casos donde se desean comparar tratamientos **cualitativamente** diferenciados.

Para un conjunto de  $k$  coeficientes de regresión,  $b_{Y.X}$ , para que sean significativamente diferentes a un nivel  $\alpha$  de significación, otra forma posible consiste en ver si la suma de cuadrados entre  $b$ 's debe ser igual o mayor que:

$$SC_{CRIT} = (k-1) \cdot \overline{S}_{Y.X}^2 \cdot F_{\alpha; (v_1; v_2)}$$

donde:  $v_1 = k-1$

$$v_2 = \sum^k a - 2k$$

o bien, el  $F$  calculado ( $F_s$ ) deberá ser mayor que el  $F$  de tablas correspondiente ( $F_{\alpha; (v_1; v_2)}$ ).

Suponiendo tener cinco sistemas modelo a considerar, si resulta:

$$SC_{entre\ b's} \geq SC_{CRIT}$$

o:  $F_{calculado}(F_s) \geq F_{\alpha; (v_1; v_2)}$

entonces se concluye que hay diferencia significativa entre los cinco coeficientes de regresión ( $b$ ) comparados, y a los que llamaremos  $b_1$ ;  $b_2$ ;  $b_3$ ;  $b_4$  y  $b_5$ , respectivamente.

Se procede a comparar entonces cuatro de las cinco pendientes recién analizadas:

a)  $b_1$ ;  $b_2$ ;  $b_3$  y  $b_4$ .

Existe diferencia significativa entre las cuatro pendientes.

b) Se prueba lo mismo con  $b_2$ ;  $b_3$ ;  $b_4$  y  $b_5$ .

Si no dan significativamente diferentes las pendientes,

$$\left. \begin{array}{l} \sum^k (\Sigma y^2) \\ \sum^k \Sigma xy \\ \sum^k \Sigma x^2 \end{array} \right\} \rightarrow SC_{\text{entre b's}}$$

$$\begin{array}{l} \text{Si } SC_{\text{entre b's}} \geq SC_{\text{CRIT}} \\ \text{O: } FS \geq F_{\alpha; (v_1; v_2)} \end{array}$$

no necesitan hacerse subconjuntos de  $b_2$ ;  $b_3$ ;  $b_4$  y  $b_5$  para comparar.

c) Comparación entre  $b_1$  y otras pendientes: restan hacerse otras posibilidades de comparación.

$b_1$ ;  $b_2$  y  $b_3$ :

$$SC_{\text{entre b's}} > SC_{\text{CRIT}}$$

entonces paso a comparar:

$b_1$  y  $b_2$ .

Aunque pueden hacerse más comparaciones (1,3; 1,4; 1,2,4; 1,3,4), a esta altura está claro que  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_4$  y  $b_5$  no son significativamente diferentes entre sí, mientras que  $b_1$  es significativamente diferente de los otros coeficientes de regresión (Sokal y Rohlf, 1969).

#### A1.2.7. Cálculo de la energía de activación

La energía de activación, según Arrhenius, se determina según:

$$\begin{aligned} k &= A_0 \cdot e^{-Ea/RT} \\ \ln k &= \ln A_0 - \frac{Ea}{RT} \end{aligned}$$

Mediante el test de regresión lineal ya visto y, previa transformación logarítmica para linealizar, se halló la pendiente estimada ( $b_{Y,X}$ ).

El problema es que para calcular la energía de activación se utilizan en general tres pares X;Y para

$$b_{Y.X} = \frac{Ea}{R}$$

$$Ea = b_{Y.X} \cdot R$$

determinar la ecuación de regresión lineal estimada. Ello es debido a que se cuenta con no más de tres temperaturas ensayadas posibles, siendo  $X = 1/T$ , donde T es la temperatura absoluta. En consecuencia, n es igual a 3 y por lo tanto el intervalo de confianza será calculado con un t (de Student) de n-2 grados de libertad:

$$n - 2 = 3 - 2 = 1$$

$$t_{(n-2)} = 12,71 \quad (\text{para un 95\% de probabilidad})$$

Esto determina que el intervalo de confianza sea muy grande. Sin embargo, existen impedimentos experimentales que no hacen posible aumentar el número de temperaturas ensayadas, entre otras cosas el hecho de que debe existir una diferencia de por lo menos 10° entre dos temperaturas sucesivas para ver alguna diferencia real o significativa entre las velocidades de reacción resultantes, de manera que priven aquéllas sobre los errores experimentales. Además, desde el punto de vista de la investigación, tendrá sentido estudiar lo que ocurre en un determinado rango de temperaturas, lógico desde el punto de vista de los alimentos.

Labuza y Kamman (1983) consideraron este hecho y propusieron, entre otras posibilidades, la que fuera elegida en el presente trabajo para calcular las energías de activación y sus intervalos de confianza. Esto es, utilizar en el cálculo de la ecuación de regresión estimada, el límite superior y el límite inferior del intervalo de confianza de cada constante de velocidad de reacción determinada a una dada temperatura. Así el n o número de pares X;Y será ahora 6 y en consecuencia habrá 4 grados de libertad y el intervalo de confianza resultará considerablemente menor.

## APENDICE 2: MECANISMO Y VELOCIDAD DE REACCION

### **A2.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION: ENERGIA DE ACTIVACION**

Un aumento de temperatura produce casi invariablemente un aumento significativo de la velocidad de una reacción química; el aumento de la velocidad específica de una **reacción homogénea** está expresado, en general, por un factor de aumento de 2 ó 3 ( $Q_{10}$ ) por cada 10 grados de aumento de temperatura. La variación real de la velocidad específica depende de la **naturaleza de la reacción**.

La variación de la **constante de velocidad** de una reacción con la temperatura puede expresarse por medio de una ecuación en la cual se hace intervenir el factor de Boltzmann ( $e^{-Ea/RT}$ ):

$$k = A \cdot e^{-Ea/RT} \quad (\text{A2.1})$$

Esta es una forma de la **ecuación de Arrhenius**; por razones que se verán más adelante, **A** se denomina a veces **factor de frecuencia**, mientras que **Ea** es la energía de activación de la reacción.

El marcado efecto de la temperatura en el aumento de la proporción de moléculas que poseen grandes velocidades, o lo que es lo mismo, con grandes energías cinéticas, queda determinado por el factor exponencial  $e^{-Mc^2/2RT}$  que aparece en la ecuación de Maxwell:

$$\frac{1}{n} \cdot \frac{dn}{dc} = 4\pi \cdot \left( \frac{M}{2\pi RT} \right)^{3/2} \cdot e^{-Mc^2/2RT} \cdot c^2$$

donde el miembro de la izquierda es, virtualmente (aunque no exactamente), la fracción del número total de moléculas (**n**) que poseen una velocidad particular **c**. Además **M** es el peso molecular del gas cuya reacción está considerando Maxwell, **R** es la constante de los gases (expresada en erg/grado·mol,

si la velocidad  $c$  está dada en cm/seg);  $T$  es la temperatura absoluta y  $e$  es la base de los logaritmos naturales. Se puede determinar así, en un gas dado de peso molecular  $M$ , a una temperatura  $T$ , la fracción de moléculas que tienen una velocidad  $c$  determinada.

La cantidad  $1/2 Mc^2$  del factor exponencial de  $e$  indicado, es igual a la energía cinética de un mol de moléculas, cada una de las cuales tiene la misma velocidad  $c$ ; ésta puede ser reemplazada por  $E_a$ , que representa la energía cinética de dichas moléculas, de modo que el factor exponencial, es el frecuentemente llamado factor de Boltzmann y que puede ser escrito en función de la energía de activación  $E_a$  indicada ( $e^{-E_a/RT}$ ).

Aplicando logaritmos en la ecuación (A2.1) se encuentra que:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (\text{A2.2})$$

La ecuación (A2.2) es la ecuación de una recta  $\ln k = f(1/T)$ , cuya pendiente es igual a  $-E_a/R$ . Por lo tanto, en base al valor de esta pendiente se puede calcular  $E_a$ , que es una constante característica de la reacción y que determina la influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción. Para dos reacciones que tengan velocidades específicas del mismo orden, a la misma temperatura aproximadamente, el aumento de la velocidad de reacción con la temperatura será tanto mayor cuanto mayor sea la energía de activación del proceso (Glasstone y Lewis, 1962).

Hay dos teorías principales en uso para tratar de explicar el problema de las velocidades de reacción:

La teoría de las colisiones

La teoría del estado de transición o del complejo activado (de Eyring)

Para que la teoría del complejo activado pueda ser aplicada la reacción debe ser térmica y no difusionalmente controlada, pues los factores que determinan las barreras de

energía potencial en los dos tipos de reacciones son bastante diferentes (Leffler y Grunwald, 1963).

## A2.2. TEORIA DE LAS COLISIONES

Considérese una reacción bimolecular entre una molécula A y una molécula B; para que la reacción se produzca, estas dos moléculas deben chocar. Empleando la ecuación (A2.3), se puede calcular el número de tales colisiones que se producen entre las moléculas de A y de B a temperatura y concentración (o presión) dadas; si se compara el resultado con el número de moléculas que reaccionan, determinado por experimentación directa, se encuentra casi invariablemente que el número de choques es mucho mayor.

$$Z_{A,B} = n_A \cdot n_B \sigma_{A,B}^2 \left( 8\pi RT \cdot \frac{M_A + M_B}{M_A \cdot M_B} \right)^{1/2} \quad (\text{A2.3})$$

$Z_{A,B}$  : número de choques que se producen por segundo en 1 cm<sup>3</sup>  
 $n_A$  y  $n_B$  : números de moléculas respectivos en la unidad de volumen

$M_A$  y  $M_B$  : pesos moleculares correspondientes

$\sigma_{A,B}$  : diámetro de choque medio = 1/2 ( $\sigma_A + \sigma_B$ )

A y B : moléculas que intervienen en un choque.

Otra discrepancia aparente entre los resultados experimentales y los que resultan de la ecuación (A2.3) surge cuando se considera el efecto de la temperatura.

De las ecuaciones (A2.3) y (A2.4) se ve que la frecuencia de los choques binarios, es decir, entre dos moléculas, es proporcional a  $T^{1/2}$ .

$$Z = 2 n^2 \sigma^2 \cdot \sqrt{\frac{\pi RT}{M}} \quad (\text{A2.4})$$

De las ecuaciones (A2.3) y (A2.4), un aumento en la temperatura, digamos de 500 a 510°K, aumentaría la frecuencia

de choque en un factor de  $(510/500)^{1/2} = 1,01$  ó 1%. Sin embargo, a partir de los datos experimentales se observa que la velocidad de la reacción química puede aumentar en un 200 por ciento o más.

Los resultados experimentales pueden explicarse si se postula que cuando chocan dos moléculas, la reacción se produce sólo si poseen energía en exceso con respecto a una cierta cantidad. Todos los otros choques son ineficaces y no conducen a reacción alguna. La energía mínima que las moléculas deben adquirir antes de que puedan reaccionar por choques es igual, en primera aproximación, a la energía de activación  $E_a$  deducida anteriormente. Como consecuencia de los impactos mutuos de las moléculas de un gas hay un continuo intercambio de energía entre ellas; como resultado hay siempre una pocas moléculas que poseen energías que exceden notablemente el valor normal o medio (Fig. A10).

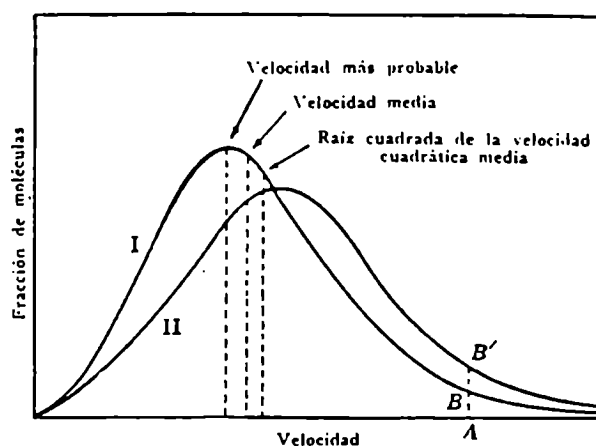


Fig. A10. Ley de Maxwell de la distribución de las velocidades moleculares.

Es posible, pues, tener colisiones entre moléculas que poseen la elevada energía de activación  $E_a$  necesaria para la



reacción pero el número de tales choques será una fracción muy pequeña del número total de colisiones que se producen en el gas. Esto explica el hecho de que sea efectiva para la reacción sólo una pequeña proporción de los choques. **A medida que aumenta la temperatura, aumenta rápidamente el número de moléculas que posee la energía elevada necesaria, y aunque el número total de choques no cambia mucho, la proporción de colisiones efectivas aumenta mucho más. De esta manera puede explicarse el notable efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción.**

Si las moléculas A y B que intervienen en una reacción dada pudieran tratarse como esferas rígidas, poseyendo sólo energía de traslación (cinética), la energía de activación se reduciría a energía traslatoria a lo largo de la dirección en que chocan las moléculas. En este caso **la proporción de colisiones en las cuales las moléculas poseen energía en exceso** con respecto a la cantidad mínima  $E_a$  requerida para que se produzca la reacción es igual al factor de Boltzmann  $e^{-E_a/RT}$ . Es la gran variación de la temperatura en este factor, antes que la frecuencia de los choques, lo que explica el aumento notable de la velocidad de reacción con la temperatura. Por ej., si  $E_a$  es 40.000 cal, entonces a 500°K,  $e^{-E_a/RT}$  será  $4,27 \times 10^{-16}$ , pero a 510°K es  $9,46 \times 10^{-16}$ , lo que representa un aumento en un factor mayor de dos, es decir superior a 100 por ciento.

**Si Z representa el número total de choques**, dado por la ecuación (A2.3) o por la (A2.4), el número real de colisiones que producen una reacción será igual a  $Z e^{-E_a/RT}$ , ya que este producto da el **número de choques efectivos**. Cuando las dos moléculas que reaccionan son iguales, debe tenerse en cuenta el hecho de que el número de moléculas que reacciona es igual, por supuesto, a dos veces el número de colisiones efectivas. La comparación de la expresión teórica  $Z e^{-E_a/RT}$ , con la ecuación experimental (A2.2) indica que la primera es por lo menos de forma correcta; se ve que el **factor de frecuencia A en la ecuación de Arrhenius es equivalente a la frecuencia de choque Z**, de acuerdo con los argumentos expuestos más

arriba.

Por ejemplo, si el número de moléculas de ioduro de hidrógeno que chocan por segundo a 556°K y a una concentración de 1 mol por litro es  $6 \times 10^{31}$  por ml; éste es igual a  $2Z$  calculado en base a la ecuación (A2.4). Como se encontró que la energía de activación para esta reacción es 44.300 cal, resulta que el factor exponencial de Boltzmann  $e^{-E_a/RT}$ , que da la fracción de choques efectivos, es  $e^{-44.300/2 \times 556}$  a 556°K, siendo suficiente considerar  $R$  igual a 2 cal. Se encuentra que la fracción exponencial es  $5 \times 10^{-18}$ , y por lo tanto, el número de moléculas que reacciona por ml debe ser el producto del número total de moléculas que chocan, es decir  $6 \times 10^{31}$  por ml, por el factor de Boltzmann,  $5 \times 10^{-18}$ , esto es,  $3 \times 10^{14}$  moléculas por ml. El resultado concuerda satisfactoriamente con el valor dado más arriba, que es  $2 \times 10^{14}$  moléculas por ml, calculado en base a datos experimentales sobre la disociación del ioduro de hidrógeno a 556°K y a una concentración de 1 mol por litro. Como el valor de  $E_a$  usado en los cálculos precedentes se basaba en mediciones de velocidad en un intervalo de temperaturas, se podría obtener un acuerdo igualmente satisfactorio entre velocidades de reacción observadas y calculadas para otras temperaturas.

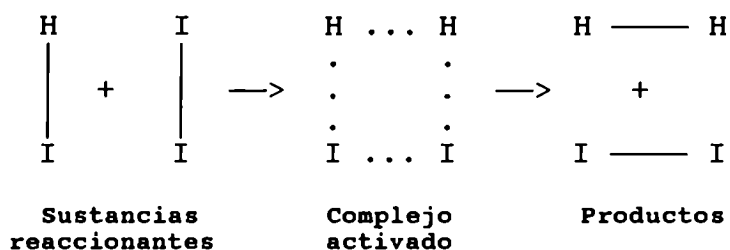
Es exacto que para la disociación del ioduro de hidrógeno, y también para la combinación del hidrógeno y del yodo gaseoso, y para otros pocos casos más, el producto del número de choques  $Z$  por el factor exponencial  $e^{-E_a/RT}$  da resultados que concuerdan con las velocidades de reacción observadas dentro del límite de un factor igual a diez. Sin embargo, en muchos otros casos, los valores calculados y observados difieren considerablemente. Para la combinación de dos moléculas de etileno la discrepancia es un factor del orden de 2000, mientras que en la reacción entre etanol y vapores de anhídrido acético a 79°C, y entre sulfuro de carbonilo y vapor de agua a unos 300°C, las velocidades calculadas son mayores que en un factor  $10^5$  a  $10^6$ .

Al tratar de explicar estas discrepancias debe recordarse que la identificación de  $Z e^{-E_a/RT}$  con la velocidad de reacción **se basa en la suposición** de que las moléculas que reaccionan se comportan como **esferas rígidas**, y que la energía de activación es de **carácter traslatorio**. Cuando las moléculas que reaccionan son relativamente simples, como en la descomposición del ioduro de hidrógeno o en la combinación de hidrógeno y yodo, se asimilan a esferas rígidas, y los cálculos dados más arriba se aplican aproximadamente. En cambio, para las moléculas más complicadas la aproximación de esferas rígidas no resulta satisfactoria, y **además de la energía de traslación** hay que tomar en cuenta varias formas de **energía de rotación y vibración**. Las moléculas adquieren la elevada energía necesaria para la reacción como resultado de intercambios por choque, pero la **energía debe distribuirse** en forma adecuada entre las varias rotaciones y vibraciones antes de que se pueda efectuar la reacción. El número de choque también está dado en este caso por  $Z$ , pero el factor simple  $e^{-E_a/RT}$  no determina más la probabilidad de que de un choque resulte una reacción. No se ha podido idear hasta ahora ningún método directo para calcular la fracción de choques eficaces en el caso general de que las moléculas no sean esferas rígidas, de modo que se han desarrollado otros métodos para aproximarse a la solución de este problema.

### **A2.3. TEORIA DEL COMPLEJO ACTIVADO PARA LA VELOCIDAD DE REACCION**

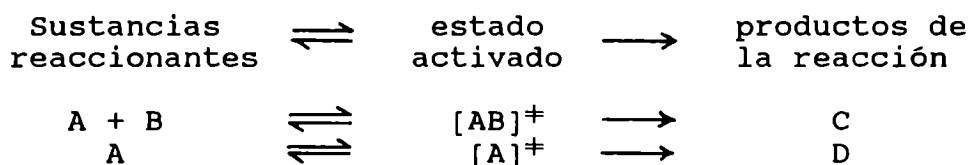
Uno de los aspectos más importantes de la teoría de la velocidad de reacción se basa en el concepto de la existencia de un **complejo activado** o **estado activado** como estado intermedio en todas las reacciones químicas. En una reacción que comprende dos o más moléculas, las sustancias reaccionantes que poseen suficiente energía se pueden acercar mucho entre sí; debe producirse entonces **una redistribución conveniente de las uniones de valencia** y de la energía para

dar el complejo activado característico de la reacción dada. El complejo activado se considera como una molécula que sólo difiere de las moléculas normales en un aspecto: tiene una existencia transitoria y se descompone a una velocidad definida para dar los productos de la reacción. Por ejemplo, la descomposición bimolecular del ácido iodhídrico se puede representar en la forma siguiente:



Aún en una reacción monomolecular, en la cual interviene una sola molécula en cada paso químico, es necesario que se produzca alguna redistribución de átomos y de energía para dar el complejo activado, como paso previo a la reacción. La energía de activación de una reacción se define como la energía adicional que deben adquirir las moléculas de las sustancias reaccionantes para formar el complejo activado necesario para la reacción. En otras palabras, es la diferencia de energía entre complejo activado y sustancias reaccionantes.

Suponiendo que haya un estado de equilibrio entre las moléculas reaccionantes y el complejo activado que se descompone a una velocidad definida, tal como



se ha encontrado que es posible deducir una ecuación para la velocidad específica (k) de cada reacción; esta ecuación es de la forma siguiente:

$$k = \frac{RT}{Nh} K^\ddagger \quad (\text{A2.5})$$

donde R y T tiene su significado usual; N es el número de Avogadro, h es la constante de la teoría de los cuantos de Planck, R/N es la constante de Boltzmann ( $k_B$ ) y  $K^\ddagger$  es la constante de equilibrio entre el estado activado y las sustancias reaccionantes (Eyring, 1935):

$$K^\ddagger = \frac{[AB]^\ddagger}{[A][B]}$$

$$K^\ddagger = \frac{[A]^\ddagger}{[A]}$$

Los valores de las constantes indicadas son los siguientes:

$$k_B = 1,38 \times 10^{-16} \text{ erg}/^\circ\text{C} = \text{constante de Boltzmann}$$

$$h = 6,6 \times 10^{-27} \text{ erg} \cdot \text{s} = \text{constante de Planck}$$

Si se utilizan las ecuaciones termodinámicas corrientes:

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K \quad (\text{A2.6})$$

$$\text{y} \quad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ \quad (\text{A2.7})$$

donde:  $\Delta G^\circ$  = diferencia de energía libre entre el estado final y el estado inicial de referencia, por mol

$\Delta H^\circ$  = diferencia de entalpía en iguales condiciones

$\Delta S^\circ$  = diferencia de entropía en iguales condiciones

K = constante de equilibrio entre los productos y los reactivos a la temperatura T.

Transformando en exponencial la ecuación (A2.6), resulta:

$$K = e^{-\Delta G^\circ/RT}$$

Reemplazando por (A2.7), entonces queda:

$$K = e^{\Delta S^\circ/R} \cdot e^{-\Delta H^\circ/RT}$$

Introduciendo esto en la ecuación (A2.5) en lugar de la constante de equilibrio  $K^\ddagger$  para la formación del complejo

activado, resulta:

$$k = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{-\Delta G^*/RT} \quad (\text{A2.8})$$

$$k = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-\Delta H^*/RT} \quad (\text{A2.9})$$

donde  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  y  $\Delta H^\ddagger$  son la energía libre, la entropía y la entalpía de activación, respectivamente. Estas cantidades representan la diferencia entre los valores de las funciones termodinámicas respectivas para los complejos activados y las sustancias reaccionantes, tomados todos en sus estados normales de actividad unitaria. Debido a la naturaleza transitoria del complejo activado no es posible pensar en la determinación de sus propiedades termodinámicas por mediciones directas; no obstante, por otros caminos es posible obtener datos útiles. Es interesante observar que el factor  $RT/Nh$  de las ecuaciones (A2.5), (A2.8) y (A2.9) es una constante universal y no contiene referencia alguna a las sustancias reaccionantes o al estado activado.

Se ve que de acuerdo con la ecuación (A2.8), la velocidad específica de la reacción a una temperatura dada está determinada por  $\Delta G^\ddagger$ , energía libre de activación. Este es un resultado de gran importancia. Entre otras cosas, es evidente que cuando mayor es la energía libre de activación, tanto más lenta es la velocidad de reacción a una temperatura dada. En la ecuación (A2.9) el factor energía libre se ha reemplazado por la entropía ( $\Delta S^\ddagger$ ) y la entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ). Este último se puede identificar, por lo menos aproximadamente, con la energía de activación experimental ( $E_a$ ), de modo que

$$k = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (\text{A2.10})$$

Si comparo esta ecuación con la de Arrhenius (A2.1):

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

se ve que las dos expresiones, (A2.1) y (A2.10), se hacen

idénticas si el factor de frecuencia A de esta última se representa, aproximadamente, por:

$$A = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{\Delta S^\ddagger/R} \quad (\text{A2.11})$$

(Glasstone y Lewis, 1962).

De acuerdo con Labuza (1980) y recordando que la ecuación de Arrhenius es:

$$k = A \cdot e^{-Ea/RT}$$

se puede calcular:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial (1/T)} = - \frac{Ea}{R}$$

Si se calcula la misma derivada a partir de la ecuación (A2.9) (y suponiendo que  $\Delta S^\ddagger$  no es función de la temperatura T), resulta:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial (1/T)} = - \left( \frac{\Delta H^\ddagger}{R} + T \right)$$

Igualando los segundos miembros:

$$\frac{Ea}{R} = \frac{\Delta H^\ddagger}{R} + T$$

o sea:

$$Ea = \Delta H^\ddagger + RT$$

ecuación que permite un cálculo más exacto de  $\Delta H^\ddagger$  a partir de la energía de activación Ea.

Una vez conocida  $\Delta H^\ddagger$ , puede calcularse  $\Delta S^\ddagger$  a partir de la ecuación (A2.9).

En la teoría del choque simple para la velocidad de reacción, discutida al principio, el factor A se consideró equivalente al número de choque Z, pero en este tratamiento se ve que tiene un significado diferente.

Sin embargo, para moléculas simples que se pueden tratar como esferas rígidas,  $A$ , tal como lo da la ecuación (A2.11), resulta igual a la frecuencia de choque. Por esto, en el caso de moléculas simples, las dos teorías son idénticas, tal como debía suceder. Con sustancias reaccionantes más complejas, cuando la teoría de los choques no es aplicable, todavía es satisfactoria la ecuación (A2.11). Cuando las sustancias que reaccionan contienen un número de átomos relativamente grande, la formación del estado activado está generalmente acompañado por una gran disminución de la entropía, es decir,  $\Delta S^\ddagger$  tiene un valor negativo bastante grande. En este caso la cantidad  $e^{\Delta S^\ddagger/R}$  en la ecuación (A2.11) es pequeña y como  $RT/Nh$  es la misma para todas las reacciones, resulta que el factor de frecuencia  $A$  será mucho menor que lo que sería con sustancias reaccionantes simples. Esto explica el hecho de que el valor experimental de  $A$  sea con frecuencia menor que el número de choque  $Z$  en un factor que puede llegar a  $10^6$  (Glasstone y Lewis, 1962).

#### A2.4. CALCULO DE $\Delta H^\ddagger$ Y $\Delta S^\ddagger$

A partir de la relación de Arrhenius, se determina la energía de activación ( $E_a$ ):

$$k = f(1/T) - E_a$$

Como se viera en el punto A2.3, a partir de la siguiente ecuación se puede calcular la diferencia de entalpía del complejo activado a cada temperatura correspondiente a la  $E_a$  hallada:

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT$$

La diferencia de entropía del complejo activado se calcula mediante la ecuación (A2.9) del ítem A2.3:



$$k = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-\Delta H^*/RT}$$

La diferencia de energía libre ( $\Delta G^\ddagger$ ) del complejo activado se calcula en base a la relación termodinámica:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$$

## 7 - BIBLIOGRAFIA

Andreotti, R. 1957. "Sui fenomeni di imbrunimento non enzimatici dei succhi concentrati di pomodoro". *Industria conserve*, 83-89.

Angyal, S.J. 1973. "Complex formation between sugars and metal ions". *Pure and Applied Chemistry* 35(2): 131-146.

Arya, S.S. 1980. "Stability of sorbic acid in aqueous solutions". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28: 1246-1249.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. Arlington, Virginia, U.S.A.

Aylward, F. and Haisman, D. 1969. *Adv. in Food Res.* 17: 7-13 y 17.

Banks y Board, J.G. 1982. "Comparison of methods for the determination of free and bound sulphur dioxide in stored British fresh sausage". *J. Sci. Food Agric.* 33: 197-203.

Bauernfeind, J.C. y Pinkert, D.M. 1970. "Food Processing with added ascorbic acid". *Adv. in Food Research* 18: 219-315.

Bentsath, A.; Rusznyak, I. y Szent-Gyorgi, A. 1936. "Vitamin P: Flavonoids as Vitamins". *Nature* 138: 798.

Bielski, B.H.J.; Allen, A.O. y Schwarz, H.A. 1981. "Mechanism of disproportionation of ascorbate radicals" *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3516-3518.

Bielsky, B.H.J. 1982. "Chemistry of ascorbic acid radicals". In "Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism and Uses". P.A. Seib & B.M. Tolbert (eds.), *Adv. Chem. Ser. N° 200*. American Chemical Society, Washington D.C.; 81-99.

Blackadder, D.A. y Hinshelwood, C. 1958. "The kinetics of the decomposition of the addition compounds formed by Sodium bisulphite and a series of Aldehydes and Ketones. Part II". Chem. Soc., 2720 y 2728.

Blaedel, W.J. y Meloche, V.W. 1963. "Elementary quantitative analysis. Theory and Practice". 2nd. Edition. Harper & Row, Pub. New York, Evanston and London.

Blanchard, J. 1991. "Depletion and Repletion kinetics of Vitamin C in humans". J. of Nutrition **121**(2): 170-176.

Blaug, S.M. y Hajratwala, B. 1972. "Kinetics of aerobic oxidation of ascorbic acid". J. Pharmaceut. Sci. **61**(4): 556.

Block, G.; Patterson, B. y Subar, A. 1992. "Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence". Nutr. Cancer **18**: 3-4.

Block, G. y Langseth, L. 1994. "Antioxidant vitamins and disease prevention". Food Technology, July, 80-84.

Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O. y Trevisan, L.M.V. 1973. "Estudos sobre a reacao de Maillard. 1. Efeitos da temperatura e do pH". An. Acad. Brasil. Cienc. **45**: 419.

Borsook, H.; Davenport, H.W.; Jeffreys, C.E.P. y Warner A.C. 1937. "The oxidation of ascorbic acid and its reduction in vitro and in vivo". J. Biol. Chem. **117**: 237-279.

Bowers-Komro, D.M. y Mc Cormick, D.B. 1991. "Characterization of Ascorbic Acid uptake by aisolated rat kidney cells". J. of Nutrition **121**(1): 57-64.

Braverman, 1982. "Vitamins". Cap. 14; pág. 211.

Buera, P.; Chirife, J.; Resnik, Silvia y Lozano, R.D. 1986. "Effect of Potassium sorbate on colour changes in a glucose-glycine system of high water activity". *Lebensmittel-Wiss.u.-Technol.* **19**: 491-492.

Buera, M.P.; Chirife, J.; Resnik, S. y Lozano, R. 1986. "Effect of Potassium sorbate on colour changes in a glucose-glycine system of high water activity". *Lebens.-Wiss.u.-Technol.* **19**: 491-492.

Buera, M.P.; Chirife, J.; Resnik, S. and Wetzler, G. 1987. "Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: Kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different with caramelization browning". *J. of Food Sci.* **52**(4): 1063-1067.

Burriel Martí; Lucena Conde y Arribas Jimeno. 1972. "Química Analítica Cualitativa", pág. 217. Ed. Paraninfo, Magallanes 21, Madrid 15, España.

Burriel Martí; Lucena Conde y Arribas Jimeno. 1985. "Química Analítica Cualitativa", pág. 1022, Ed. Paraninfo, Magallanes 21, Madrid, España.

Burton, H.; Ford, J.; Perkin, A.; Porter, J.; Scott, K.; et al. 1970. "Comparison of milks processed by the direct and indirect methods of ultra-high-temperature sterilization..." *J. Dairy Res.* **37**(3): 529.

Cadenas, E. 1989. "Biochemistry of oxygen toxicity". *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 79-110.

Cerrutti, P.; Resnik, S.L.; Seldes, A. y Ferro Fontán, C. 1985. "Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: glucose loss, 5-hydroxymethylfurfural accumulation and fluorescence development due to nonenzymatic browning". *J. of Food Sci.* **50**: 627-630 y 656.

Chaterjee, I.B.; Kar, N.C.; Ghosh, N.C. y Guha, B.C. 1961. Ann. N.Y. Acad. Sci. **92**: 36. Nature, London **192**: 163.

Chaterjee, I.B.; Majunder, A.K.; Nandi, B.K. y Subramanian, N. 1975. "Synthesis and some major functions of vitamin C in animals". Annals of the N.Y. Academy of Sciences **258**: 24-47.

Cheftel, J.C. y Cheftel, H. 1976. "Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos". Vol. I, pág. 291. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

Chirife, J.; Ferro Fontán, C. y Benmergui, E. 1980. "The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV.  $a_w$  prediction in aqueous non electrolyte solutions". J. of Food Technol. **15**: 59-70.

Chirife, J.; Favetto, G.; Ferro Fontán, C. y Resnik, S. 1983. "The water activity of standard saturated salt solutions in the range of intermediate moisture foods". Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie. **16**: 36-38.

CIEPS. División Envases Metálicos. Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). Argentina (Comunicación Personal).

Clark, L. 1956. Trans. Amer. Soc. Art. Int. Organs **2**: 41.

Clegg, K.M. 1964. "Non enzymic browning of lemon juice". J. Sci. Food Agric. **15**: 878.

Clegg, M. y Morton A.D. 1965. "Carbonyl compounds and the non-enzymic browning of lemon juice". J. of the Sci. of Food and Agr. **16**, Abril, 191-8.

Código Alimentario Argentino (actualizado). 1980. Ed. por de la Canal y Asociados S.R.L., Buenos Aires, Argentina.

Curl, A.L. 1949. "Ascorbic acid losses and darkening on storage at 49°C of synthetic mixtures analogous to orange juice". Food Res. Vol. 14, 9-14.

Davies, C.G.A. y Wedzicha, B.L. 1994. "Ascorbic acid browning: the incorporation de C1 from ascorbic acid into melanoidins". Food Chemistry 49: 165-167.

Dawber, J.G. y Brown D.R. 1966. "Acid-catalyzed hydrolysis of sucrose". Journal of Chem. Educ. 43(1): 34-45.

De Vries, J. 1983. "Semiautomated fluorometric method for determination of vitamin C in foods: Collaborative study". J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66(6): 1371-1376.

Dennison, D.B. y Kirk, J.R. 1978. "Oxygen effect on the degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system". Journal of Food Sci. 43: 609-612 y 618.

Eichner, K. 1981. "Antioxidative effect of Maillard reaction intermediates". Prog. Fd. Nutr. Sci., Vol. 5, 441-451.

Eison-Perchonok, M.H. y Downes, T.W. 1982. "Kinetics of Ascorbic Acid Autoxidation as a function of Dissolved oxygen concentration and Temperature". J. Food Sci. 47(3): 765-767 y 773.

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

Eldaway, M. 1975. Anal. Chem. 47: 461-465.

Enstrom, J.E.; Kanim, L.E. y Klein, M.A., 1992. "Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population". Epidemiology 3: 194-202.

FAO/OMS, Comité Mixto 1965-1973. Informe de requerimientos nutricionales recomendados.

Farmacopea Nacional Argentina, VI Ed., 1978, pág 36. Editorial Códex, S.A., Publicación Oficial. República Argentina.

Finholt, P.; Paulssen R.B. y Higuchi, T. 1963. "Rate studies on the anaerobic degradation of ascorbic acid I". J. of Pharm. Sci. 52(10): 948.

Finholt, P.; Paulssen, R.B.; Alsos, I. y Higuchi, T. 1965 (a) "Rate Studies on the anaerobic degradation of ascorbic acid II". J. of Pharm. Sci. 54:(1)-January.

Finholt, P.; Alsos, I. y Higuchi, T. 1965 (b). "Rate studies on the anaerobic degradation of ascorbic acid III". J. of Pharm. Sci. 54: (2) 181-186.

Flores y Brunner 1960. Galenica Acta; Madrid 13: 319.

Fodor, G. ; Arnold, R; Mohacsi, T.; Karle, I. y Flippen-Anderson, J. 1983. "A new role for L-AAs: Michael donor to  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds". Tetrahendrom 39(13): 2137-2145.

Ford, J.E. 1967. "The influence of the dissolved oxygen in milk on the stability of some vitamins towards heating and during subsequent exposure to sunlight". J. Dairy Res. 34(3): 239.

Franks, F. 1969. "Physico-Chemical Processes and Mixed Aqueous Solvents". 1st. Edition, Heinemann Educational Books Ltd. 48 Charles Street, London, England.

Franks, F. 1984. "Water". 1st. Ed. Revisada. The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London W1V 0BN.

Friedman, M. 1982. "Chemically reactive and unreactive lysine as an index of browning". *Diabetes*, **31**, (6), Junio, supplement 3, 5-14.

Furia, T. 1975. "Handbook of Food Additives", 2nd. Ed., por CRC Press, Boca Raton, Cap. 10.

Garrido y Sarchi, 1990. "Bioestadística". Publicación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Gillam, W. 1945. "Polarographic determination of vitamin C in fruits and vegetables". *Ind. and Eng. Chem.* **17**(4): 217-221.

Glasstone, S. y Lewis, D. 1962. "Elementos de química-física". 2ª edición. Editorial Médico-Quirúrgica, Buenos Aires, Argentina.

Goodwin, T.W. 1963. "The Biosynthesis of vitamins and related compounds". Academic Press Inc. (London), Chapter 11, págs. 210-231.

Gray, J.I.; Reddy, S.K.; Price, J.F.; Mandagere, A. y Wilkens, W.F. 1982. "Inhibition of N-nitrosamines in bacon". *Food Technol.* **36**: 39-45.

Grigera, J.R. 1976. "Introducción a la biofísica del agua". Cap. I, págs. 14 y 15. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Rivadavia 1571/73. Buenos Aires. Argentina.

Grigera, J.R. 1988. "Conformation of polyols in water" *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **84**(8): 2603-2608.

Hägglund, E. y Ringbom, A. 1926. "On the addition of sulphite to unsaturated compounds. *Z. Anorg. Allgem. Chem.*, **150**, 231-53.



Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1989. "Free radicals in Biology and Medicine". 2da. ed.; Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.

Handwerk, R.L. y Coleman, R.L. 1988. "Approaches to the Citrus browning problem. A review". J. of Agricultural and Food Chem., Enero/Febrero, 231-236.

Harris, L.; Mapson, L. y Wang, Y. 1942. "Vitamin methods". The Bioch. Journal **36**: 183-195.

Hayashi, T.; Terao, A.; Veda, S. y Namiki, M. 1985 "Red pigment formation by the reaction of oxidized ascorbic acid and protein in a food model sistem of low moisture content". Agric. Biol. Chem. **49**: 3139-3144.

Heintze, K. 1976. "Mutual effects of sorbic acid and sulphurous acid". Ind. Obst-Gemüseverwert, **61**, 555-6.

Henniger, G. Informe de Laboratorios Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica Werk Tutzing, Bahnhofstr. 9-15, D-8132 Tutzing.

Hikita, H.; Asai, S. y Azuma, Y. 1978. "Solubility and diffusivity of oxygen in aqueous sucrose solutions". The Canadian Journal of Chemical Engineering, **56**, June, 371-374.

Hodge, J.E. 1953. "Dehydrated Foods. Chemistry of browning reactions in model systems". Agricultural and Food Chemistry, **1**, (15), Octubre 14, 928-943.

Hsieh, Y. y Harris, N. 1987. "Copper activity in sucrose solutions". J. of Food Sci. **52**(2): 498-499.

Huelin, F.E. 1953. "Studies on the anaerobic descomposition of ascorbic acid". Food Res. **18**: 633-639.

Huelin; F.E.; Coggiola, I.M.; Sidhu, G.S. y Kenneth, B.H. 1971. "The anaerobic descomposition of ascorbic acid in the pH range of Foods and in more acid solutions". J. Sci. Fd. Agric. **22**(10): 540-542.

Intern. Critical Tables 1929. Vol. V. pág. 23. Mc Graw-Hill Book Co., Inc., New York, U.S.A.

Isaacs, M. 1942. "Colorimetric determination of vitamin C". Ind. and Eng. Chem. **14**(12): 948-949.

Isbell, H.S. y Pigman, W. 1969. "Mutarotation of sugars in solution; Part II". Adv. in Carbohydrate Chem. and Biochem., **24**, 13-57.

Ivanov y Lygin, 1968. Zh. Prikl. Khim **41**: 2722-2725.

Iyanagi, T.; Yamazaki, J. y Anon, K.F. 1985. "One-electron oxidation-reduction properties of ascorbic acid". Biochim. Biophys. Acta **806**: 255-261.

Jacob, Robert A.; Skala, J.H. y Omage, S.T. 1987. "Biochemical indices of human Vitamin C status". Am. J. Clin. Nutr. **46**: 818-826.

Jacques, P.F. y Chylack L.T.Jr. 1991. "Epidemiological evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in caratact prevention". Am. J. Clin. Nutr. **53**: 352S-355S.

Johnson, R.L. y Toledo, R.T. 1975. "Storage stability of 55°Brix orange juice concentrate aseptically packaged in plastic and glass containers". J. of Food Science, Vol. 40, 433-434.

Johnstone, H.F. y Leppla, P.W. 1934. "The solubility of sulphur dioxide at low partial pressures. The ionisation constant and heat of ionisation of sulphurous acid". J. Amer. Chem. Soc., **56**, 2233-8.

Joslyn, M.A. y Miller, J. 1949. "Effect of sugars on oxidation of ascorbic acid. 1-Kinetics of auto-oxidation of ascorbic acid". Food Res. **14**: 325-339.

Joslyn, M.A. y Suplee, H. 1949. "Solubility of oxygen in solution of various sugars". Food Research **14**: 209-215.

Joslyn, M.A., 1957. "Role of aminoacid in the browning of orange juice". Food Res., Vol. 22, 1-15.

Kabayama, M.A. y Patterson, D. 1958. "The thermodynamics of mutarotation of some sugars. II: Theoretical considerations". Can. J. Chem. **36**: 563-573.

Kacem, B.; Cornell, J.A.; Marshall, M.R.; Shireman, R.B. y Matthews, R.F.; 1987. "Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange drinks: effect of Ascorbic Acid, Amino Acids and Oxygen". J. of Food Sci. **52**(6): 1668-1672.

Kahn y Martell 1967. "Metal ion and metal chelate catalized oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. 1. Cupric and ferric ion catalized oxidation". J. Am. Chem. Soc. **89**: 4176.

Karplow, M. 1970. "Commercial development of intermediate moisture foods". Food Technol. **24**: 889.

Kassell, B. y Brand, E. 1938. "The photometric determination of cystine, cysteine, ascorbic acid, and related compounds with phosphotungstic acid". J. of Biol. Chem. 115-129.

Kelly, G. y Latzko, E. 1980. "Prospect of a Specific Enzymatic assay for ascorbic acid (Vitamin C)". J. Agric. Food Chem. **28**: 1320-1321.

Kharin y Palash, 1967. Sakhar. Prom. **41**(12): 15-17.

Kirk, J.; Dennison, D.; Kokoczka, P. and Heldman, D. 1977 "Degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system". J. of Food Sci. **42**(5): 1274-1279.

Kirk, J. 1981. "Stability of vitamins in dehydrated foods" en: Water activity: influences on food quality. Ed. Louis B. Rockland and George F. Stewart. Acad. Press, N.Y., U.S.A.

Kitic, D. 1986. Lebensmittel-Wiss.u.-Technol. **19**: 297-301.

Koenig, R.; Schiefelbusch, T. y Johnson, C. 1943. "Chromogenic reagent for vitamin C determinations". Ind. and Eng. Chem. **15**(3): 181-182.

Krug, Hunter y Grieger. 1976(a). The Journal of Physical Chemistry **80**(21): 2335-2341.

Krug, Hunter y Grieger. 1976(b). The Journal of Physical Chemistry **80**(21): 2341-2351.

Kurata, T.; Fujimaki, M. y Sakurai, Y. 1973. "Red Pigment produced by the reaction of dehydro-L-ascorbic acid with  $\alpha$ -aminoacid". Agr. Biol. Chem. **37**: 1471-1477.

Kuratam, T. y Sakurai, Y. 1967(a). "Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. Part I". Agr. Biol. Chem. **31**(1): 101-105.

Kurata, T. y Sakurai, Y. 1967(b). "Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. Part II". Agr. Biol. Chem. **31**(2): 170-176.

Kurata, T. y Sakurai, Y. 1967(c). "Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. Part III". Agr. Biol. Chem. **31**(2): 177-184.

Kyrtopoulos, S.A. 1987. "Ascorbic acid and the formation of N-nitroso compounds: possible role of ascorbic acid in cancer prevention". Am. J. Clin. Nutr. **45**: 1344-1350.

Labuza, T.P.; Tannenbaum, S.R. y Karel, M. 1970. "Water content and stability of Low-Moisture and intermediate-moisture foods". Food Technol. **24**: 544-550.

Labuza, T. 1980. "Enthalpy/Entropy compensation in food reactions". Food Technology, Febrero, 67-77.

Labuza, T. y Riboh, D. 1982. "Theory and Application of Arrhenius kinetics to prediction of nutrient losses in foods". Food Technology, Octubre, pág. 66-74.

Labuza, T. y Kamman, J.K. 1983. "Reaction kinetics and accelerated tests simulation as a function of temperature (Chapter 4)", pág. 87 a 90, en "Computer aided techniques in food technology", editado por Israel Saguy, impreso por Marcel Dekker Inc., New York, U.S.A.

Labuza, T., 1994. "Shelf life testing short course". National Food and Nutrition Consultants. VI Congreso Argentino de Alimentos.

Laing, B.; Schlueter, D. y Labuza, T.P. 1978. "Degradation kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity". J. Food Sci. **43**: 1440.

Lamb, F. 1946. "Nutritive value of canned foods. Factors affecting ascorbic acid content of canned grapefruit and orange juices" Ind. and Engineering Chem. **38**(August): 860-864.

Lamden, M. y Harris, R. 1949. "Browning of ascorbic acid in pure solutions".

Lathrop, P.J. and Leung, H.K. 1980. "Rates of ascorbic acid degradation during thermal processing of canned peas". *J. of Food Sci.* **45**: 152-153.

Lattanzio, V., Linsalata, V., Palmieri, S. y Van Sumere, C.F. 1989. "The beneficial effect of citric and ascorbic acid on the phenolic browning reaction in stored artichoke (*Cynara scolymus*, L.) heads". *Food Chemistry* **33**: 93-106.

Ledward, D.A. 1982. "Intermediate moisture meats". En: "Developments in meat science". Ed. R. Laurie, p. 159; Applied Science Pub. Ltd., England.

Lee, S. and Labuza, T. 1975. "Destruction of ascorbic acid as a function of water activity". *J. Food Sci.* **40**: 370.

Lee, Y.C.; Kirk, J.R.; Bedford, C.L. y Heldman, D.R. 1977. "Kinetics and computer simulation of ascorbic acid stability of tomato juice as functions of temperature, pH and metal catalyst". *J. of Food Sci.* **42**(3): 640-644 y 648.

Leffler, J. y Grunwald, E. 1963. "Rates and Equilibria of organic reactions". John Wiley and Sons, Inc., New York and London.

Leffler, J. 1966. "The interpretation of enthalpy and entropy data". *J. Org. Chem.* **31**: 533.

Lehninger, A. 1959. *Proc. 4th. Int. Cong. Biochem.* **11**: 17.

Lehninger, A.L. 1982. "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Edic. Omega, S.A., Barcelona, España. 2ª Edición, 5ª reimpresión.

Leistner, L. 1992. "Food preservation by combined methods". Food Research International 25: 151-158.

Levy, L. 1943. "The determination of ascorbic acid in the presence of sulphur dioxide". Biochem. J. 37: 713-716.

Levine, M. y Morita, K. 1985. "Ascorbic acid in endocrine systems". Vitamins and Hormones, Vol. 42, pág 3. Academic Press, Inc.

Liao, M.L. y Seib, P.A. 1988. "Chemistry of L-ascorbic acid related to foods". Food Chemistry 30: 289-312.

Lin, S.H. y Agalloco, J. 1979. "Degradation Kinetics of ascorbic acid". Process Biochemistry 14(9): 22-26 y 32.

Loeffler, H.J. 1941. "Processing of orange juice. Effect of storage temperature on quality factors of bottled juice". Industrial and Engineering Chemistry, Octubre, 1308-14.

Lugg, J. 1942. "Use of formaldehyde in the estimation of ascorbic acid and dehydro-ascorbic acid". Nature, London 150: 577.

Lumry, R. y Rajender, S. 1970. Biopolymers 9: 1125.

Marchesini, A.; Montuori, F. y Muffato, D. 1974. "Application and advantages of the enzymatic method for the assay of ascorbic and dehydroascorbic acids and reductones". J. of Food Sci. 39: 568-571.

Martell, A. 1982. "Chelates of ascorbic acid: Formation and catalytic properties". In: "Ascorbic acid: Chemistry, metabolism and uses". Ed. P.A.Seib and B.M. Tolbert, Adv. Chem. Ser. No. 200. American Chemical Society, Washington, D.C., 153-178.

Mathews, J. y Jackson R. 1933. "The stability of levulose in aqueous solutions of varying pH". J. Res. Nat. Bur. Stds. **11**: 619.

Mathlouthi, M. y Seuvre, A.-M. 1988. "Solution properties and the Sweet Taste of Small Carbohydrates". J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, **84**(8): 2641-2650.

Merck Index, 1983. 10ª Edición, Publicado por Merck and Co., Inc., Rahway, New Jersey, U.S.A.

Míkova, K. 1979. "Dept. of canning". Scientific paper of the Prague Institute of Chemical Technology.

Míkova, K.; Kyzlink, V. y Heinzova, A. 1981. "Oxidative destruction of L-ascorbic acid in the presence of glutamic acid and copper". Scientific paper of the Prague Institute of Chemical Technology E52, pp. 15-35.

Miller, J. y Joslyn, M.A. 1949(a). "Effect of sugars on oxidation of ascorbic acid II. General and specific effects". Food Res. **14**: 340-353.

Miller, J. y Joslyn, M.A. 1949(b). "Effect of sugars on oxidation of ascorbic acid. III. Influence of pH and type of buffer". Food Res. **14**: 354-363.

Mirvish, S.S.; Wallcave, L.; Eagen, M. y Shubik, P. 1972. "Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds". Science **177**, 65-68.

Mohr, D.H., Jr. 1980. "Oxygen mass transfer effects on the degradation of vitamin C in foods. J. of Food Sci. **45**: 1432-1433.



Mokady, S.; Cogan, U. y Lieberman, L. 1984. "Stability of Vitamin C in fruits and fruit blends". J. Sci. Food Agric., **35**: 452-456.

Montes, L. 1975. "Bromatología": Vitamina C, Vol.2. Ed. Eudeba, Argentina.

Montes de Oca, C.; Gerschenson, L.N. y Alzamora, S.M. 1991. "Effect of the addition of fruit juices on water activity of sucrose-containing model systems during storage". Lebens.-Wiss. u.- Technol. **24**: 375-377.

Nagy, S. y Smooth, J.M. 1977. "Temperature and Storage effects on Percent retention and percent U.S. Recommended Dietary of vitamin C in canned single-strength orange juice". J. Agric. Food Chem. **25**(1): 135-138.

Narten, A.H.; Danford, M.D. y Levy, H.A. 1967. "X-Ray Diffraction Study of Liquid Water in the Temperature range 4-200°C". Discuss. Faraday Soc., Nº **43**, 97-107.

Olson, J.A. y Hodges, R.E. 1987. "Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin C in humans". Am. J. Clin. Nutr. **45**: 693-703.

Pachla, L.; Reynolds, D. y Kissinger, P. 1985. "Review of ascorbic acid methodology". J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**(1).

Pelletier, O. y Brassard, R. 1977. "Determination of vitamin C (L-ascorbic acid and dehydroascorbic acid) in food by manual and automated photometric methods". J. of Food Sci. **42**(6): 1471-1477.

Pepkowitz, L. 1943. "The rapid determination of ascorbic acid by the adaptation of Stotz's method to plant materials". J. of Biol. Chem. **151**: 405.

Perry, R. y Chilton, C. 1973. "Chemical Engineer's Handbook". 5th. Ed., Mac Graw-Hill, New York.

Petriella, C.; Resnik, S.L.; Lozano, R.D. y Chirife, J. 1985. "Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to non enzymatic browning". J. Food Sci. **50**: 622.

Pino, J. y Sánchez Penichet, L. 1981. "Estudio de la destrucción del ácido ascórbico durante el almacenaje del jugo concentrado de naranja". Revista Ciencias Químicas **12**(2): 135-141.

Portela, M.L. 1975. "Curso de Bromatología", Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Reichardt, C. 1979. "Solvent effects in organic chemistry". Verlag Chemie Weinheim, New York.

Reyes, F.; Boonthong Poocharoen y Wrolstad, R. 1982. "Maillard Browning reaction of sugar-glycine model systems: changes in sugar concentration, color and appearance" J. of Food Sci. **47**: 1376-1377.

Riemer, J. y Karel, M. 1978. "Shelf-like studies of vitamin C during food storage: prediction of L-ascorbic acid retention in dehydrated tomato juice". J. of Food Processing and Preserv. **1**: 293-312.

Robertson, G.L. y Samaniego, C.M.L. 1986. "Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage". J. of Food Science **51**(1): 184-187 y 192.

Robertson J.M.; Donner, A.P. y Trevithick, J.R. 1989. "Vitamin E intake and risk of cataracts in humans". Ann. N.Y. Acad. Sci. **570**: 372-382.

Robinson, W.B. y Stotz, E. 1945. "The indophenol-xylene extraction method for ascorbic acid and modifications for interfering substances". J. of Biol. Chem. **160**: 217-225.

Robinson, R. y Stokes, R. 1968. "Electrolyte solutions", págs. 457 y 544. Butterworths Publications Limited, 2da. Ed. revisada, London: 88 Kingsway W.C. 2.

Roe, J. y Kuether, C. 1943. "The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid". J. Biol. Chem. **147**: 399.

Sadler, G.D.; Roberts, J. y Cornell, J. 1988. "Determination of oxygen solubility in liquid foods using a dissolved oxygen electrode". J. of Food Science **53**(5): 1493-1496.

Sahbaz, F. y Somer, G. 1993. "The effect of citrate anions on the kinetics of cupric ion-catalysed oxidation of ascorbic acid". Food Chem. **47**: 345-349.

Sapper, H.; Kang, S.O.; Paul, H.H. y Lohmaun, W. 1982(a). "The reversibility of the vitamin C redox system: Electrochemical reasons and biological aspects". Z. Naturforsch. C: Biosci. **37C**: 942-946.

Sapper, H.; Pleyer-Weber, A. y Lohmaun, W. 1982(b). "<sup>1</sup>H-NMR and ESR investigations on the structures of dehydroascorbic acid and the semidehydroascorbate radical". Z. Naturforsch. C: Biosci. **37**: 129-31.

Saunders, J. y Jervis, F. 1966. "The role of buffer salts in non-enzymatic browning". J. Sci. Food Agric. **17**: 245.

Sawyer, D.T.; Chiericato, G., Jr. y Tsuchiya, T. 1982. "Oxidation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by superoxide ion in aprotic media". J. Am. Chem. Soc. **104**: 6273-6278.

Schoebel, T.; Tannenbaum, S.R. y Labuza, T.P. 1969. "Reaction limited water concentration. 1. Sucrose hydrolysis". J. Food Sci. **34**: 324.

Seaver, J. y Kertesz, Z. 1946. "The browning (Maillard) reaction" in heated solutions of uronic acids". J. Am. Chem. Soc. **68**: 2178-2179.

Sebrell y Harris. 1954. "The Vitamins". Acad. Press. Inc.; 1<sup>o</sup> Ed.; N.Y., U.S.A.

Seow, C.C. y Cheah, P.B. 1985. "Reactivity of sorbate and glycerol in non-enzymatic browning in liquid intermediate model moisture systems". Food Chemistry **18**: 71-80.

Shaw, P.E.; Tatum, J.H. y Berry, R.E. 1967. "Acid-catalyzed degradation of D-fructose". Carbohyd. Research **5**: 266-273.

Singh, B.; Dean, G.R. y Cantor, S.M. 1948. "The role of 5-hydroxymethyl-furfural in the discoloration of sugar solutions". J. Am. Chem. Soc. **70**: 517.

Singh, P.; Heldman, D.R. y Kirk, J.R. 1976. "Kinetics of quality degradation: Ascorbic Acid oxidation in an infant formula during storage". J. of Food Sci. **41**: 304-308.

Smooth, J.M. y Nagy, S. 1980. "Effects of Storage Temperature and duration on Total vitamin C content of canned single-strenght grape fruit juice". J. Agric. and Food Chem. **28**(2): 417-421.

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

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1969. "Biometry. The principles and Practice of statistics in Biological Research". Publicado por W.H. Freeman and Co., San Francisco, U.S.A., Cap. 14.

Spark, A.A. 1969. "Role of aminoacids in nonenzymic browning". J. Sci. Food Agric. **20**: 308.

Stotz, E. 1941. J. Lab. and Clin. Med. **26**: 1542.

Strohecker, R. y Henning, H.M. 1965. "Vitamin Assay: Tested Methods" pág. 231, Verlag Chemie.

Sugget, A. 1975. "Water: A Comprehensive Treatise" (ed. F. Franks) Vol. 4; p. 531; Plenum, New York.

Suzan Kincal, N. y Cigdemgiray. 1987. "Kinetics of ascorbic acid degradation in potato blanching". Int. Jour. of Food Sci. and Technol. **22**: 249-254.

Szent-Gyorgi, A. 1927. "The Chemistry of the Adrenal Cortex". Nature (London) **119**: 782-783.

Szent-Gyorgi, A. 1928. "Observation on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex". Biochem. J. **22**: 1387-1409.

Tannenbaum, S. 1976. "Vitaminas y minerales" Cap. 7; pág. 407-411, del libro: "Introducción a la Ciencia de los Alimentos", Fennema, Ed. Reverté, S.A.

Taylor, J.B. y Rowlinson, J.S. 1955. "The thermodynamic properties of aqueous solutions of glucose". Trans. Faraday Soc. **51**: 1183-1192.

Tewari, C.P. and Krishman, P.S. 1961. "Loss of ascorbic acid during estimation by the Roe-Kuether method". J. Food Sci. **26**: 11.

Tillmans, J. 1927. Z. Untersuch. Lebensm **54**: 33-43.

Tono, T. y Fujita, S. 1982. Agric. Biol. Chem. **46**(12): 2953-2959.

Tono, T. y Fujita, S. 1983. Nippon Shokuji Kogyo Gakkaishi. **30**(7): 414-420.

"United States Pharmacopeia", Vol. XXI, NF XVI U.S., 1985. Pharmacopeial Convention, Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Md. 20852.

Van Dam, H.E.; Kieboom, A.P.G. y van Bekkum, H. 1986. "The conversion of fructose and glucose in acidic media: formation of hydroxymethylfurfural". Starck/Stärke **38**(3): S. 95-101.

Vidyasagar K. y Arya S.S. 1983. "Stability of sorbic acid in fruit squashes and fish paste". J. of Food Technology **19**: 447-454.

Vinson, J.A. y Bose, P. 1983. "Comparative bioavailability of synthetic and natural vitamin C in guinea pigs". Nutrit. Reports Internat. **27**(4): 875-880.

Von Euler y Hasselquist. 1952. Arkiv Kewi **4**: 169.

Waletzko y Labuza, T.P. 1976. "Shelf-life testing of an intermediate moisture food in air and in an oxygen-free atmosphere". J. of Food Sci. **41**: 1338-1344.

Wanninger, L.A., Jr. 1972. "Mathematical model predicts stability of ascorbic acid in food products". Food Technol. **26**: 642-645.

Wartenberg, E.W. 1982. "Zur problematik der mindesthaltbarkeit von fruchtsaften in unterschiedlichen verpackungen". Verpackungs-Rundschau 9: 58-63.

Wedzicha, B.L. 1984. "Chemistry of sulphur dioxide in foods". Elsevier Applied Science Publishers ltd., Ripple Road, Barking, Essex, England.

Wills, R.B.H.; Pushparani Wimalasiri y Greenfield, H. 1984. "Dehydroascorbic acid levels in fresh fruit and vegetables in relation to total vitamin C activity". J. of Agr. and Food Chem. 32: 836-838.

Wolfson, M.L. y Shilling, W.L. 1951. "Action of heat on D-fructose. III. Interconversion D-glucose". J. Am. Chem. Soc., Aug., Vol. 73, 3557-3558.

Wong, M. y Stanton, D.W. 1989. "Nonenzymic browning in kiwifruit juice concentrate systems during storage". J. of Food Sci. 54(3): 669-673.

## **8 - TABLAS DE DATOS**



**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5.**

(Sistema A)

Temperatura: 24 C

Tpo. (d)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.64	33.64	0.00	2.89	3.51	0.942	0.99
0.00	32.53	32.53	0.00				0.99
26.67	27.87			0.16	3.51		0.99
26.67	27.46						0.99
54.64	25.41	33.62	8.21	0.18	3.54	0.941	0.98
54.64	23.12	29.01	5.89				0.99
89.77	23.17	29.45	6.28	0.15	3.60		0.96
89.77	23.74	28.72	4.98				0.96
132.92	20.60	26.21	5.61	0.17	3.62	0.940	0.91
132.92	19.99	27.54	7.55				0.91
180.72	15.81	17.81	2.00	0.13	3.61		0.91
180.72	15.87	16.26	0.39				0.91
210.85	12.02					0.938	0.90
210.85	12.38						

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5.**

(Sistema A)

Temperatura: 33 C

Tpo. (d)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.64	33.64	0.00	2.89	3.51	0.942	0.99
0.00	32.53	32.53	0.00				0.99
25.61	25.04	25.23	0.19	0.20	3.50	0.940	0.99
25.61	27.71	28.45	0.74				0.99
55.68	21.33	27.32	5.99	0.16	3.57		0.98
55.68	20.98	25.29	4.31				0.98
84.68	18.93	25.43	6.50	0.17	3.58	0.940	0.98
84.68	14.93	23.18	8.25				0.98
122.91	15.45			0.14	3.60		0.88
122.91	13.50						0.87
150.66	7.50	18.19	10.69	0.14	3.59	0.939	
150.66	7.77	19.45	11.68				

*SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5.*

*(Sistema A)*

*Temperatura: 45 C*

<i>Tpo. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>33.64</i>	<i>33.64</i>	<i>0.00</i>	<i>2.89</i>	<i>3.51</i>	<i>0.942</i>	<i>0.99</i>
<i>0.00</i>	<i>32.53</i>	<i>32.53</i>	<i>0.00</i>				<i>0.99</i>
<i>24.63</i>	<i>21.77</i>	<i>24.79</i>	<i>3.02</i>	<i>0.16</i>	<i>3.53</i>	<i>0.939</i>	<i>0.97</i>
<i>24.63</i>	<i>24.41</i>	<i>24.80</i>					<i>0.99</i>
<i>56.81</i>	<i>16.54</i>	<i>19.25</i>	<i>2.71</i>	<i>0.14</i>	<i>3.68</i>		<i>0.92</i>
<i>56.81</i>	<i>17.85</i>	<i>20.16</i>					<i>0.94</i>
<i>86.86</i>	<i>10.81</i>				<i>3.71</i>		
<i>87.70</i>	<i>9.11</i>	<i>15.96</i>	<i>6.85</i>	<i>0.19</i>	<i>3.70</i>	<i>0.940</i>	<i>0.86</i>
<i>103.28</i>	<i>9.62</i>				<i>3.72</i>	<i>0.940</i>	

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5.**

(Sistema A)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	31.42	31.42	0.00	5.32	3.52	0.940	0.92
0.00	30.03	30.03	0.00				0.92
19.00	29.17			0.53	3.50		0.90
19.00	26.73						0.90
66.17	23.83	23.80	0.00	0.50	3.51	0.942	0.90
66.17	23.59	23.62	0.03				0.90
88.17	23.16	28.13	4.97	0.46	3.50		
88.17	24.53	29.15	4.62				
138.17	20.01	25.60	5.59	0.56	3.52	0.940	0.85
138.17	21.20	26.39	5.19				0.85

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5.**

(Sistema A)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	31.42	31.42	0.00	5.32	3.52	0.940	0.92
0.00	30.03	30.03	0.00				0.92
15.66	26.02	29.21	3.19	0.27	3.50		0.87
15.66	25.63	29.50	3.87				0.87
39.83	22.19			0.20	3.50	0.940	
70.49	18.49	23.95	5.46	0.52	3.50		0.79
70.49	17.30	20.71	3.41				0.79
91.99	15.64	20.18	4.54	0.33	3.51	0.938	
141.99							0.65
141.99							0.65

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5.**

(Sistema A)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	31.42	31.42	0.00	5.32	3.52	0.940	0.92
0.00	30.03	30.03	0.00				0.92
15.66	24.10	26.29	2.19	0.20	3.50		0.81
15.66	22.81	26.92	4.11				0.81
39.83	16.48			0.23	3.50		
66.49	10.67	21.88	11.21	0.33		0.940	0.50
66.49	7.59	21.26	13.67				0.50
88.49	6.24	9.53	3.05	0.41	3.52	0.939	
88.49	6.24	11.57	5.56				
138.49							0.27
138.49							0.27

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 4,1.**

(Sistema B)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.47	33.47	0.00	5.20	4.11	0.942	0.96
0.00	31.91	31.91	0.00				0.96
45.17	26.34	30.47	4.13	0.14	4.12	0.936	
45.17	25.71	27.69	1.98				
95.67	23.29	28.55	5.26	0.16	4.13		0.93
95.67	23.87	29.04	5.17				0.93
115.92	20.36			0.20	4.13	0.938	0.90
115.92	20.34						0.86
166.67		24.31		0.30	4.13	0.940	0.89
211.67	15.01	21.38	6.37	0.22	4.15		0.85
211.67	15.84	23.52	7.68				0.84

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 4,1.**

(Sistema B)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.47	33.47	0.00	5.20	4.11	0.942	0.96
0.00	31.91	31.91	0.00				0.96
25.00	24.24	27.72	3.48	0.17	4.12		0.92
25.00	27.13	30.40	3.27				0.94
47.75	21.97	27.17	5.20	0.22	4.13	0.938	
47.75	19.69	24.64	4.95				
95.67	10.74	16.85	6.11	0.35	4.13	0.940	0.61
115.92	9.53	12.65	3.12	0.30	4.13		0.64
115.92	9.37	12.50	3.13				0.64

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 4,1.**

(Sistema B)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.47	33.47	0.00	5.20	4.11	0.942	0.96
0.00	31.91	31.91	0.00				0.96
25.00	21.93	25.49	3.56	0.25			0.86
25.00	22.11	26.26					0.80
47.75	11.05	15.14	4.09		4.15		0.59
47.75	11.30	16.42					0.59
73.17	5.12	10.06	4.94	0.17	4.19	0.939	0.28
73.17							0.31

*SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 5,0.*

*(Sistema C)*

*Temperatura: 70 C*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	30.52	30.52	0.00	2.71	5.03	0.941	0.98
0.00	30.32	30.32	0.00				0.98
22.75	28.73			0.30	5.04	0.942	0.98
22.75	28.63						0.98
47.42	24.60	28.78	4.18	0.30	5.09		0.95
47.42	23.40	28.25	4.85				0.94
117.00	24.06	28.03	3.97	0.27	5.08	0.940	0.91
117.00	17.80	23.53	5.73				0.74
168.75	19.50			0.29	5.12		0.56
217.38	15.27	21.46	6.19	0.25	5.13	0.942	

*SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 5,0.*

*(Sistema C)*

*Temperatura: 80 C*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	30.52	30.52	0.00	2.71	5.03	0.940	0.98
0.00	30.32	30.32	0.00				0.98
22.75	24.81	28.08	3.27	0.30	5.01		0.93
22.75	25.33	29.22	3.89				0.94
47.42	19.40	22.46	3.06	0.32	5.07	0.938	0.74
47.42	20.16	21.97	1.81				0.80
69.17	15.49	20.05	4.56	0.30	5.07		0.58
69.17	15.28	19.03	3.75			0.942	0.61
117.00	7.25				5.10		0.28
117.00	6.75						0.28

*SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 5,0.*

*(Sistema C)*

*Temperatura: 90 C*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	30.52	30.52	0.00	2.71	5.03	0.940	0.98
0.00	30.32	30.32	0.00				0.98
22.75	22.40	26.41	4.01	0.20	5.00	0.943	0.75
22.75	22.31	26.44	4.13				0.76
47.42	8.53	9.68	1.15	0.20	4.94		0.25
47.42	8.77	12.25	3.48			0.942	0.25
69.17	0.69	0.72	0.03	0.28	4.96		0.02
69.17	2.01	3.51	1.50				0.07

*SISTEMA MODELO CON SORBITOL, pH 3,5.*

*(Sistema D)*

*Temperatura: 24 C*

<i>Tpo. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.98	33.98	0.00	3.20	3.50	0.942	0.99
0.00	33.98	33.98	0.00				0.99
14.08	20.29	27.36	7.07		3.50		0.96
14.08	21.49	25.73	4.24	0.16	3.53		0.97
29.77	19.52	23.17	3.65	0.18	3.56	0.939	
45.88	15.26	17.19	1.93	0.15	3.58		0.91
45.88	19.74	20.47	0.73				0.92
48.78	14.56	20.24	5.68	0.17	3.60	0.943	0.95
91.18	11.10	15.00	3.90	0.15	3.60		
91.18	7.10	12.70	5.60		3.65	0.941	

*SISTEMA MODELO CON SORBITOL, pH 3,5.*

*(Sistema D)*

*Temperatura:33 C*

<i>Tpo. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.98	33.98	0.00	3.20	3.50	0.942	0.99
0.00	33.98	33.98	0.00				0.99
13.09	21.30	27.72	6.42	0.18	3.52	0.939	0.96
13.09	20.82	25.37	4.55				0.96
29.77	14.56	18.08	3.52	0.15	3.58		0.96
36.91	13.46	18.12	4.66	0.13	3.60	0.939	
48.78	10.89			0.12	3.61		0.93
78.91	6.52			0.12	3.67		0.90

*SISTEMA MODELO CON SORBITOL, pH 3,5.*

*(Sistema D)*

*Temperatura: 45 C*

<i>Tpo. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.98	33.98	0.00	3.20	3.50	0.942	0.99
0.00	33.98	33.98	0.00				0.99
13.09	16.22	23.46	7.24	0.20	3.51		0.94
13.09	14.37	21.16	6.79				0.94
20.76	8.27	16.42	8.15	0.17	3.55	0.943	0.92
20.76	10.85	14.36	3.51				0.93
29.77	7.90	15.22	7.32	0.15	3.61		0.93
29.77	4.44	11.04	6.60				0.92
36.91	3.20			0.13	3.62	0.940	0.90

**SISTEMA MODELO CON SORBITOL.**

(Sistema D)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.44	33.44	0.00	3.42	3.52	0.942	0.94
0.00	33.48	33.48	0.00				0.94
44.42	26.78	28.65	1.87	0.38	3.50	0.940	0.94
44.42	26.24	27.03	0.79				0.94
90.85	24.05			0.33	3.61		0.93
90.85	24.76						0.93
140.34	23.16	24.54	1.38	0.20	3.72	0.941	0.92
140.34	23.80	25.22	1.42				0.92
332.42	18.21	19.93	1.72	0.29	3.68		0.90
332.42	17.62	18.12	0.50				0.90

**SISTEMA MODELO CON SORBITOL.**

(Sistema D)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.44	33.44	0.00	3.42	3.52	0.941	0.94
0.00	33.48	33.48	0.00				0.94
18.94	26.46	27.77	1.31	0.49	3.51		0.91
18.94	26.13	27.15	1.02				0.91
47.09	27.76			0.29	3.52	0.942	0.90
47.09	27.17						0.90
90.85	20.73	21.79	1.06	0.30	3.64	0.940	
90.85	20.23	22.09	1.86				
140.34	17.08				3.70		
187.34	10.43	13.16	2.73	0.30	3.70	0.940	0.87
187.34	14.01	15.55	1.54				0.88
332.42	9.47	10.78	1.31	0.27	3.70	0.939	0.87
332.42	9.26	10.61	1.35				0.88

**SISTEMA MODELO CON SORBITOL.**

(Sistema D)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.44	33.44	0.00	3.42	3.52	0.940	0.94
0.00	33.48	33.48	0.00				0.94
18.94	25.82	25.51	0.00	0.46	3.51		0.91
18.94	25.67	24.77	0.00				0.91
44.42	22.38	22.40	0.02	0.32	3.49	0.940	0.92
44.42	18.99	19.55	0.56				0.92
90.85	11.23	13.08	1.85	0.23	3.49		0.88
90.85	8.96	10.21	1.25				0.88
187.34				0.27	3.69	0.938	0.81
187.34							0.76

*SISTEMA MODELO CON SACAROSA, pH 3,5.*

*(Sistema E)*

*Temperatura: 24 C*

<i>T po. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.12	33.12	0.00	2.56	3.50	0.938	0.96
0.00	33.78	33.78	0.00				0.96
45.80	26.93	30.37	3.44	0.18	3.52		0.96
45.80	27.99	29.35	1.36				0.95
74.05	24.39	29.01	4.62	0.13	3.61	0.939	0.95
89.97	21.38	23.69	2.31	0.14	3.60		0.94
117.72	15.48	18.33	2.85	0.10	3.65		0.86
137.90	13.16	13.35	0.19	0.04	3.62	0.938	0.87
137.90	15.22	17.81	2.59				0.87
201.71	10.34			0.05	3.61	0.940	0.82
201.71	8.27						0.85

*SISTEMA MODELO CON SACAROSA, pH 3,5.*

*(Sistema E)*

*Temperatura: 33 C*

<i>T po. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.12	33.12	0.00	2.56	3.50	0.938	0.96
0.00	33.78	33.78	0.00				0.96
44.88	20.13	21.54	1.41	0.15	3.55		0.93
44.88	22.14	22.14	0.00				0.94
73.86	16.41	18.77	2.36	0.12	3.61	0.940	0.90
73.86	16.40	20.20	3.80				0.90
89.08	13.15	15.31	2.16	0.14	3.59		0.88
115.95	7.59	11.64	4.05	0.16	3.64	0.940	0.83
115.95	8.49	11.70	3.21				0.82
142.64	5.31			0.12	3.69	0.937	0.73

*SISTEMA MODELO CON SACAROSA, pH 3,5.*

*(Sistema E)*

*Temperatura: 45 C*

<i>T po. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.12	33.12	0.00	2.56	3.50	0.938	0.96
0.00	33.78	33.78	0.00				0.96
39.88	24.19	31.20	7.01	0.12	3.59		0.90
39.90	24.39	28.90	4.51				0.88
72.88	10.62	16.71	6.09	0.10	3.61	0.937	0.69
74.00	10.62	19.52	8.90				
87.89				0.11	3.65		0.61
87.89						0.936	0.61



**SISTEMA MODELO CON SACAROSA, pH 3,5.**

(Sistema E)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.37	33.37	0.00	3.37	3.51	0.938	0.96
0.00	31.61	31.61	0.00				0.96
21.55	28.85	32.05	3.20	0.22	3.46		0.80
21.55	28.94	30.15	1.21				0.80
67.00	24.11	28.80	4.69	0.20	3.47	0.938	0.75
67.00	23.16	27.19	4.03				0.75
94.30	18.68			0.18	3.42	0.940	0.70
161.35	9.89	12.00	2.11	0.00	3.39		0.34

**SISTEMA MODELO CON SACAROSA, pH 3,5.**

(Sistema E)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.37	33.37	0.00	3.37	3.51	0.938	0.96
0.00	31.61	31.61	0.00				0.96
18.38	26.23	28.73	2.50	0.00	3.49	0.940	0.78
18.38	26.21	27.38	1.17				0.78
43.52	14.49	16.00	1.51	0.00	3.39		0.49
43.52	13.94	15.94	2.00				0.49
70.87	6.46			0.00	3.36	0.937	0.17
70.87	6.82						0.17
91.47	2.62	3.78	1.16	0.00	3.36		0.01
91.47	2.60	3.70	1.10				0.01

**SISTEMA MODELO CON SACAROSA, pH 3,5.**

(Sistema E)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.37	33.37	0.00	3.37	3.51	0.938	0.96
0.00	31.61	31.61	0.00				0.96
9.12	25.80	27.13	1.33	0.00	3.50		
18.38	16.44	18.00	1.56	0.00	3.46	0.937	0.70
18.38	17.14	19.32	2.18				0.70
43.52	2.07	3.12	1.05	0.00	3.37	0.937	0.04
43.52	3.33	3.57	0.24				0.04
67.00	0.67			0.00	3.36	0.936	0.01
67.00	1.04						0.01

**SISTEMA MODELO CON LISINA.**

(Sistema F)

Temperatura: 70 C

T po. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.14	33.14	0	5.22	3.5	0.942	0.950
0.00	32.84	32.84	0				0.950
19.67	27.51			0.32	3.54		0.840
19.67	27.61						0.830
41.33	23.82	26.72	2.9	0.28	3.52	0.939	0.595
41.33	23.01	27.80	4.79				0.570
65.83	14.15	19.46	5.31	0.16	3.53	0.94	0.130
65.83	15.2	18.12	2.92				0.120
90.17	8.87	13.15	4.28	0.18	3.44		0.010
90.17	9.89	14.18	4.29				0.015
114.5	4.43	10.3	5.87		3.4	0.938	0.000

**SISTEMA MODELO CON LISINA.**

(Sistema F)

Temperatura: 80 C

T po. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.14	33.14	0	5.22	3.5	0.943	0.950
0.00	32.84	32.84	0				0.950
9.76	28.72			0.3	3.5		
19.67	22.1	26.84	4.74	0.3	3.54	0.942	0.330
19.67	21.24	20.69	0				0.350
40.08		11.54		0.16			0.000
41.33	5.66	13.82	8.16	0.18	3.48	0.939	0.000
41.33	4.56	14.19	9.63				0
45.5	3.06			0.18	3.39		0.000
45.50	3.07						0.000

**SISTEMA MODELO CON LISINA.**

(Sistema F)

Temperatura: 90 C

T po. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.14	33.14	0	5.22	3.5	0.943	0.950
0.00	32.84	32.84	0				0.950
5.17	28.57	31.12	2.55	0.28	3.5	0.941	0.760
5.17	27.2	31.5	4.3				0.720
9.67	20.98	28.04	7.06	0.19	3.51		0.220
9.67	21.27	28.7	7.43				0.230
17	7.68	16.52	8.84	0.27	3.48	0.942	0.000
17	9.17	15.27	6.1				0
27	2.69	5.89	3.2	0.14	3.39	0.938	0.000
27.00	2.14	5.89	3.75				0.000

*SISTEMA MODELO CON Sn (II).*

*(Sistema G)*

*Temperatura: 70 C*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.95	33.95	0.00	5.22	3.50	0.942	0.92
0.00	33.79	33.79	0.00				0.92
16.85	28.71			0.21	3.53	0.941	0.91
16.85	29.89						0.91
40.88	29.03	33.08	4.05	0.18	3.58		0.90
40.88	29.01	34.02	5.01			0.944	0.91
64.95	26.63	31.09	4.46	0.15	3.61		0.89
89.92	25.07	29.11	4.04	0.19	3.75		0.87
89.92	25.11	28.92	3.81				0.88
160.95	19.03	25.40	6.37	0.16	3.78		0.83
216.88	16.74	22.34	5.60	0.17	3.70	0.942	0.74
216.88	16.74	23.02	6.28		3.71		

*SISTEMA MODELO CON Sn (II).*

*(Sistema G)*

*Temperatura: 80 C*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.95	33.95	0.00	5.22	3.50	0.942	0.92
0.00	33.79	33.79	0.00				0.92
16.85	28.16			0.18	3.58	0.940	0.90
16.85	29.87						0.90
40.88	22.74	28.03	5.29	0.19	3.61		0.88
40.88	23.78	29.95	6.17				0.88
64.95	18.38	24.52	6.14	0.22	3.59	0.943	0.79
64.95	15.89	21.59	5.70				0.77
89.92	14.32	19.78	5.46	0.15	3.71		0.72
89.92	14.35	18.92	4.57				0.73
160.95	6.76	12.62	5.86	0.16	3.68	0.939	0.53
160.95	7.36	14.89	7.53				0.55

*SISTEMA MODELO CON Sn (II).*

*(Sistema G)*

*Temperatura: 90 C*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>33.95</i>	<i>33.95</i>	<i>0.00</i>	<i>5.22</i>	<i>3.50</i>	<i>0.942</i>	<i>0.92</i>
<i>0.00</i>	<i>33.79</i>	<i>33.79</i>	<i>0.00</i>				<i>0.92</i>
<i>16.85</i>	<i>25.17</i>	<i>29.06</i>	<i>3.89</i>	<i>0.19</i>	<i>3.55</i>		<i>0.89</i>
<i>16.85</i>	<i>25.86</i>	<i>30.87</i>	<i>5.01</i>				<i>0.88</i>
<i>40.88</i>	<i>14.06</i>	<i>21.79</i>	<i>7.73</i>	<i>0.15</i>	<i>3.58</i>	<i>0.938</i>	<i>0.72</i>
<i>40.88</i>	<i>14.71</i>	<i>22.06</i>	<i>7.35</i>				<i>0.73</i>
<i>48.75</i>	<i>12.25</i>	<i>19.61</i>	<i>7.36</i>	<i>0.17</i>	<i>3.58</i>	<i>0.940</i>	<i>0.57</i>
<i>48.75</i>	<i>11.88</i>	<i>20.16</i>	<i>8.28</i>				<i>0.58</i>
<i>64.95</i>	<i>6.00</i>	<i>15.22</i>	<i>9.22</i>	<i>0.12</i>	<i>3.67</i>		<i>0.43</i>

**SISTEMA MODELO CON ACIDO PROPIONICO.**

(Sistema H)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	31.25	31.25	0.00	3.62	3.51	0.943	0.88
0.00	31.17	31.17	0.00				0.88
19.83	26.74			0.29	3.52	0.940	0.87
19.83	28.04						0.87
64.45	24.13	30.77	6.64	0.30	3.58		0.87
64.45	24.87	27.87	3.00				0.87
136.92	20.93	27.32	6.39	0.23	3.60	0.941	0.84
136.92	20.90	24.96	4.06				0.84
208.42	15.08	22.75	7.67	0.18	3.70		0.81
208.42	15.36	20.03	4.67				0.81
312.63	11.48	13.94	2.46	0.21	3.62	0.938	0.73
312.63	11.57	11.36	0.00				0.73

**SISTEMA MODELO CON ACIDO PROPIONICO.**

(Sistema H)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	31.25	31.25	0.00	3.62	3.51	0.943	0.88
0.00	31.17	31.17	0.00				0.88
16.08	27.40	35.05	7.65	0.31	3.55	0.939	0.86
16.08	27.71	30.37	2.66				0.86
40.88	21.09	27.08	5.99	0.27	3.56		0.82
40.88	22.23	25.44	3.21				0.83
64.33	18.84			0.23	3.70	0.941	0.79
64.33	18.14						0.79
112.50	11.06	19.05	7.99	0.24	3.68		0.69
160.92	5.03	15.00	9.97	0.18	3.70	0.943	0.51
160.92	5.97	14.59	8.62				0.55

**SISTEMA MODELO CON ACIDO PROPIONICO.**

(Sistema H)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	31.25	31.25	0.00	3.62	3.51	0.943	0.88
0.00	31.17	31.17	0.00				0.88
16.08	25.03	32.57	7.54	0.22	3.53	0.936	0.85
16.08	25.01	33.00	7.99				0.85
40.88	15.76	23.38	7.62	0.13	3.62		0.70
40.88	16.81	22.20	5.39			0.937	0.77
64.33	11.75	13.72	1.97	0.12	3.61		0.62
112.50	4.36	10.08	5.72	0.15	3.70	0.942	0.49
160.92	2.02	9.51	7.49	0.20	3.68		0.29

**SISTEMA CON ACIDO FOSFORICO.**

(Sistema I)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	32.50	32.50	0.00	2.86	3.50	0.943	0.87
0.00	32.87	32.87	0.00				0.87
20.88	28.23			0.22	3.57	0.941	0.86
20.88	27.83						0.86
66.47	23.68	28.52	4.84	0.17			0.84
66.47	23.49	27.21	3.72				0.86
119.88	16.29	20.85	4.56	0.18	3.72	0.941	0.76
119.88	17.60	20.96	3.36				0.72
187.62	12.36	15.98	3.62	0.15	3.62		

**SISTEMA CON ACIDO FOSFORICO.**

(Sistema I)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	32.50	32.50	0.00	2.86	3.50	0.940	0.87
0.00	32.87	32.87	0.00				0.87
18.75	25.20	28.94	3.74	0.19	3.58		0.84
18.75	25.17						0.84
66.47	14.98	18.38	3.40	0.18	3.59		0.70
66.47							0.77
91.00	11.08	19.26	8.18	0.20	3.69	0.938	0.71
91.00							0.71
119.88	10.22	15.42	5.20	0.17	3.67		0.63
119.88	9.86	14.62	4.76				0.64
187.62	4.87			0.10	3.70	0.938	
283.75	1.68	4.76	3.08	0.15	3.70		

**SISTEMA CON ACIDO FOSFORICO.**

(Sistema I)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	32.50	32.50	0.00	2.86	3.50	0.940	0.87
0.00	32.87	32.87	0.00				0.87
18.75	23.34	28.62	5.28	0.18	3.60	0.939	0.82
18.75	23.29	28.43	5.14				0.81
66.47	7.83	14.16	6.33	0.22	3.58		0.59
91.00	5.26	11.36	6.10	0.19	3.62		0.45
91.00	5.70	11.00	5.30				0.50
119.88	2.42			0.17	3.70	0.938	

**SISTEMA MODELO CON BISULFITO.**

(Sistema J)

Temperatura: 24 C

Tpo. (d)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.88	33.88	0.00	2.91	3.51	0.942	0.99
0.00	32.86	32.86	0.00				0.99
25.83	29.60			0.19	3.53		0.99
25.83	29.57						0.99
53.80	24.82	33.18	8.36	0.15	3.60		0.98
53.80	22.14	30.67	8.53				0.98
88.93	26.22	33.11	6.89	0.18	3.68		0.98
88.93	26.28	33.44	7.16				0.97
132.25	25.34	30.55	5.21	0.12	3.70	0.940	0.97
132.25	25.42	32.46	7.04				0.97
180.14	20.14	26.81	8.27		3.67	0.938	0.96
180.14	16.94						0.94

**SISTEMA MODELO CON BISULFITO.**

(Sistema J)

Temperatura: 33 C

Tpo. (d)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.88	33.88	0.00	2.91	3.51	0.942	0.99
0.00	32.86	32.86	0.00				0.99
24.77	26.06	32.12	6.06	0.10	3.54		0.99
24.77	23.85	29.63	5.78				0.99
54.84	25.52	30.11	7.81	0.16	3.60	0.941	0.98
54.84	22.30	29.22	3.70				0.99
83.84	21.63	29.73	8.10	0.12	3.59	0.938	0.97
83.84	21.16	28.81	7.65				0.99
122.24	18.67	25.12	6.45	0.14	3.69		0.80

**SISTEMA MODELO CON BISULFITO.**

(Sistema J)

Temperatura: 45 C

Tpo. (d)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.88	33.88	0.00	2.91	3.51	0.942	0.99
0.00	32.86	32.86	0.00				0.99
23.79	24.69	26.25	1.56	0.12	3.55		0.97
23.79	24.98	25.46	0.48				0.96
55.97	20.28	22.91	2.63	0.13	3.65		0.91
55.97	17.59	20.58	2.99				0.91
86.86	10.72	18.54	7.82	0.15	3.70	0.940	0.88
86.86	10.81	15.71	4.90				0.87
103.28	9.62			0.12	3.68	0.940	0.82
103.28	7.92						0.82

**SISTEMA MODELO CON BISULFITO.**

(Sistema J)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	34.43	34.43	0.00	6.30	3.51	0.940	0.96
0.00	33.73	33.73	0.00				0.96
64.33	24.64			0.58	3.50		0.97
64.33	25.56						0.94
90.33	23.44	30.00	6.56	0.30			0.96
90.33	23.18	28.40	5.22				0.94
189.50	20.04			0.22	3.50	0.940	
236.83	17.13	21.96	4.83	0.20	3.50		0.89
236.83	18.57	23.71	5.14				0.89
304.75	15.06	23.10	8.04		3.50	0.939	0.87
304.75	15.35	18.81	3.46				0.88

**SISTEMA MODELO CON BISULFITO.**

(Sistema J)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	34.43	34.43	0.00	6.30	3.51	0.940	0.96
0.00	33.73	33.73	0.00				0.96
40.50	22.56	30.98	8.42	0.34	3.50	0.940	
40.50	24.27	27.20	2.93				
68.66	20.19						0.81
68.66	20.50						0.80
91.83	17.15	24.43	7.28	0.20	3.50		0.79
91.83	18.45	23.81	5.36				0.78
162.16	9.77	14.88	5.11	0.25	3.50	0.940	0.65
162.16	10.52	13.58	3.06				0.69

**SISTEMA MODELO CON BISULFITO.**

(Sistema J)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	34.43	34.43	0.00	6.30	3.51	0.940	0.96
0.00	33.73	33.73	0.00				0.96
20.00	25.78			0.58	3.50		
20.00	23.98						
40.50	16.75	23.05	6.30	0.67	3.50	0.937	0.65
40.50	16.32	24.86	8.54				0.65
68.66	7.68					0.938	0.58
68.66	9.75						0.58
91.83	7.33	13.05	5.72	0.30	3.50		0.64
91.83	6.44	11.25	4.81				0.62
162.16	1.32	7.34	6.02	0.15	3.49	0.940	0.25
162.16	1.29	3.15	1.86				0.26



*SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5.*

*(Sistema K)*

*Temperatura: 24 C*

<i>Tpo. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.81	33.81	0.00	4.50	3.50	1.000	1.00
0.00	34.25	34.25	0.00				1.00
3.87	28.73	30.34	1.61		3.50		1.00
3.87	28.12						1.00
6.86	25.18	28.16	2.98	0.13	3.55		1.00
6.86	25.18	29.23	4.05				1.00
11.88	28.65						0.99
11.88	23.65						0.99
13.90	21.74	27.42	5.68	0.15	3.54		0.99
13.90	20.69	25.03	4.34				0.99
15.90	22.22			0.13			0.99
15.90	22.71						0.99
19.81	19.11	24.82	5.71		3.60	1.000	0.98
19.81	19.20	22.04	2.84				0.99
30.78	16.17	21.16	4.99	0.12	3.63		0.98
36.94	7.98						0.98
44.00	8.29	11.95	3.66		3.64		0.96

*SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5.*

*(Sistema K)*

*Temperatura: 33 C*

<i>Tpo. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Ox geno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
0.00	33.81	33.81	0.00	4.50	3.50	1.000	1.00
0.00	34.25	34.25	0.00				1.00
3.87	29.30	32.46	3.16	0.19	3.50		1.00
3.87	30.36				3.50		1.00
6.86	21.31	25.04	3.73	0.18	3.51		1.00
6.86	22.38	26.14	3.76		3.52		
13.90	18.65	19.87	1.22	0.12	3.59	1.000	0.99
13.90	15.85				3.60		0.99
27.84	7.16	10.37	3.21	0.16	3.66		0.96
30.78					3.68		0.98
36.94					3.69		0.98
44.00							0.96

*SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5.*

*(Sistema K)*

*Temperatura: 45 C*

<i>T po. (d)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Ox geno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>33.81</i>	<i>33.81</i>	<i>0.00</i>	<i>4.50</i>	<i>3.50</i>	<i>1.000</i>	<i>1.00</i>
<i>0.00</i>	<i>34.25</i>	<i>34.25</i>	<i>0.00</i>				<i>1.00</i>
<i>1.80</i>	<i>28.29</i>	<i>31.93</i>	<i>3.64</i>	<i>0.24</i>	<i>3.51</i>		<i>1.00</i>
<i>1.80</i>	<i>29.05</i>	<i>32.11</i>	<i>3.06</i>		<i>3.51</i>		<i>1.00</i>
<i>3.87</i>	<i>27.81</i>	<i>29.87</i>	<i>2.06</i>	<i>0.19</i>	<i>3.51</i>		<i>1.00</i>
<i>3.87</i>	<i>27.08</i>	<i>30.46</i>	<i>3.38</i>		<i>3.50</i>		<i>1.00</i>
<i>6.88</i>	<i>14.63</i>	<i>19.51</i>	<i>4.88</i>	<i>0.16</i>	<i>3.52</i>	<i>1.000</i>	<i>0.97</i>
<i>9.84</i>	<i>4.82</i>	<i>9.51</i>	<i>4.69</i>	<i>0.12</i>	<i>3.58</i>		
<i>9.84</i>	<i>4.61</i>	<i>10.83</i>	<i>6.22</i>		<i>3.58</i>		
<i>21.02</i>	<i>1.47</i>	<i>9.40</i>	<i>7.93</i>		<i>3.63</i>		<i>0.93</i>

**SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5.**

(Sistema K)

Temperatura: 70 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.00	33.00	0.00	4.50	3.50	1.000	1.00
0.00	31.39	31.39	0.00				1.00
26.45	25.82	28.92	3.10	0.20	3.50		1.00
26.45	26.45	29.02	2.57		3.50		1.00
42.83	26.41	27.08	0.67	0.19	3.55		1.00
42.83	24.49	27.42	2.93		3.54		1.00
66.55	24.69			0.17	3.58	1.000	0.99
66.55	23.18						0.99
192.37	20.24	24.21	3.97	0.18	3.60		0.98
192.37	20.29	24.36	4.07				0.98

**SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5.**

(Sistema K)

Temperatura: 80 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.00	33.00	0.00	4.50	3.50	1.000	1.00
0.00	31.39	31.39	0.00				1.00
26.45	24.02	29.82	5.80	0.22	3.52		1.00
26.45	24.15	30.16	6.01				1.00
42.83	21.04	27.22	6.18	0.19	3.60		1.00
42.83	22.76	26.76	4.00			1.000	1.00
66.55	19.52				3.62		0.99
138.75	13.16	19.42	6.26	0.16	3.64		0.97
138.75	14.15	17.21	3.06				0.97

**SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5.**

(Sistema K)

Temperatura: 90 C

Tpo. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxígeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	33.00	33.00	0.00	4.50	3.50	1.000	1.00
0.00	31.39	31.39	0.00				1.00
26.45	22.43	25.45	3.02	0.18	3.58		1.00
26.45	21.27	26.04	4.77				1.00
42.83	18.68	19.98	1.30	0.17	3.58		1.00
66.55	15.44	17.71	2.27		3.64		0.99
66.55	12.71	17.71	5.00				0.99
138.75	7.31			0.17	3.66	1.000	0.96

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5 (AEROBIOSIS).**

(Sistema A aer)

Temperatura: 70 C

T po. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	32.51	32.51	0.00	4.20	3.50	0.943	0.98
0.00	31.28	31.28	0.00				0.98
6.08	29.61	30.70	1.09	0.09	3.65		0.97
6.08	29.07	31.02	1.95				0.97
20.00	20.10	24.14	4.04	0.08	3.72	0.941	0.94
20.00	20.86	25.23	4.37				0.93
27.50	19.45			0.04	3.73		0.94
27.50	16.52						0.92
44.25	15.10	23.40	8.30	0.05	3.75	0.941	0.91
44.25	15.10	24.09	8.99				0.90
69.50	6.07	11.52	5.45	0.02	3.75		0.84
69.50	8.03	12.72	4.69				0.85

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5 (AEROBIOSIS).**

(Sistema A aer)

Temperatura: 80 C

T po. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Oxigeno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	32.51	32.51	0.00	4.20	3.50	0.943	0.98
0.00	31.28	31.28	0.00				0.98
10.00	18.73			0.10	3.55		
20.00	11.29	16.80	5.51	0.07	3.77	0.941	0.82
27.50	8.97	22.50	13.53	0.08	3.74		0.74
27.50	8.43	18.53	10.10				0.69
34.00	6.20			0.02	3.73	0.940	

**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5 (AEROBIOSIS).**

(Sistema A aer)

Temperatura: 90 C

T po. (h)	AAs	AAs Total	DHA	Ox geno	pH	Aw	PNE
	CI (mg%)	CI (mg%)	CI (mg%)	(ppm)			T (420 nm)
0.00	32.51	32.51	0.00	4.20	3.50	0.943	0.98
0.00	31.28	31.28	0.00				0.98
6.08	24.25			0.05	3.68	0.942	0.95
6.08	26.23						0.95
20.00	11.31	17.20	5.89	0.08	3.77		0.82
20.00	8.73	14.56	5.83				0.79
27.50	5.67	15.55	9.88	0.10	3.76	0.941	0.71
27.50	5.38	19.00	13.62				0.71

*SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5 (AEROBIOSIS).*

*(Sistema K aer)*

*Temperatura: 70 C*

<i>T po. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>30.98</i>	<i>33.38</i>	<i>2.40</i>	<i>3.80</i>	<i>3.50</i>	<i>1.000</i>	<i>1.00</i>
<i>0.00</i>	<i>31.35</i>	<i>32.21</i>	<i>0.86</i>				<i>1.00</i>
<i>3.00</i>	<i>17.03</i>	<i>19.34</i>	<i>2.31</i>	<i>2.17</i>	<i>3.65</i>		<i>0.98</i>
<i>6.08</i>	<i>15.76</i>	<i>17.98</i>	<i>2.22</i>	<i>1.60</i>	<i>3.69</i>		<i>0.97</i>
<i>9.17</i>	<i>9.57</i>	<i>11.47</i>	<i>1.90</i>	<i>1.12</i>	<i>3.69</i>		<i>0.95</i>

*SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5 (AEROBIOSIS).*

*(Sistema K aer)*

*Temperatura: 80 C*

<i>T po. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>30.98</i>	<i>33.38</i>	<i>2.40</i>	<i>3.80</i>	<i>3.50</i>	<i>1.000</i>	<i>1.00</i>
<i>0.00</i>	<i>31.35</i>	<i>32.21</i>	<i>0.86</i>				<i>1.00</i>
<i>3.00</i>	<i>15.45</i>	<i>18.17</i>	<i>2.72</i>	<i>2.21</i>	<i>3.69</i>		<i>0.98</i>
<i>6.08</i>	<i>10.80</i>	<i>13.26</i>	<i>2.46</i>	<i>1.51</i>	<i>3.74</i>		<i>0.97</i>
<i>9.17</i>	<i>6.47</i>	<i>9.62</i>	<i>3.15</i>	<i>0.93</i>	<i>3.76</i>		<i>0.95</i>

*SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5 (AEROBIOSIS).*

*(Sistema K aer)*

*Temperatura: 90 C*

<i>T po. (h)</i>	<i>AAs</i>	<i>AAs Total</i>	<i>DHA</i>	<i>Oxigeno</i>	<i>pH</i>	<i>Aw</i>	<i>PNE</i>
	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>CI (mg%)</i>	<i>(ppm)</i>			<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>30.98</i>	<i>33.38</i>	<i>2.40</i>	<i>3.80</i>	<i>3.50</i>	<i>1.000</i>	<i>1.00</i>
<i>0.00</i>	<i>31.35</i>	<i>32.21</i>	<i>0.86</i>				<i>1.00</i>
<i>3.00</i>	<i>14.61</i>	<i>15.97</i>	<i>1.36</i>	<i>2.03</i>	<i>3.68</i>		<i>0.95</i>
<i>6.08</i>	<i>9.77</i>	<i>11.37</i>	<i>1.60</i>	<i>1.26</i>	<i>3.74</i>		<i>0.93</i>
<i>9.17</i>	<i>3.94</i>	<i>4.96</i>	<i>1.02</i>	<i>0.82</i>	<i>3.77</i>		<i>0.91</i>

**SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5 (AEROBIOSIS).**

*(Sistema K aer)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>1.00</i>
<i>0.00</i>	<i>1.00</i>
<i>2.83</i>	<i>0.99</i>
<i>6.17</i>	<i>0.98</i>
<i>13.58</i>	<i>0.99</i>
<i>13.58</i>	<i>0.99</i>

**SISTEMA MODELO CON BISULFITO.**

*(Sistema J)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>21.88</i>	<i>0.96</i>
<i>21.88</i>	<i>0.97</i>
<i>71.01</i>	<i>0.94</i>
<i>71.01</i>	<i>0.94</i>
<i>166.05</i>	<i>0.91</i>
<i>166.05</i>	<i>0.89</i>

**SISTEMA MODELO CONTROL, pH 3,5.**

*(Sistema K)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>Tpo. (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>1.00</i>
<i>0.00</i>	<i>1.00</i>
<i>15.25</i>	<i>0.98</i>
<i>15.25</i>	<i>0.98</i>
<i>21.97</i>	<i>0.97</i>
<i>21.97</i>	<i>0.97</i>
<i>58.45</i>	<i>0.97</i>
<i>58.45</i>	<i>0.97</i>
<i>82.53</i>	<i>0.90</i>
<i>82.53</i>	<i>0.92</i>
<i>120.91</i>	<i>0.96</i>
<i>120.91</i>	<i>0.96</i>
<i>131.00</i>	<i>0.92</i>

*SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 4,1.*

*(Sistema B)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>22.75</i>	<i>0.98</i>
<i>22.75</i>	<i>0.98</i>
<i>47.42</i>	<i>0.95</i>
<i>47.42</i>	<i>0.94</i>
<i>117.00</i>	<i>0.91</i>
<i>117.00</i>	<i>0.74</i>
<i>168.75</i>	<i>0.56</i>

*SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 5,0.*

*(Sistema C)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>27.90</i>	<i>0.85</i>
<i>27.90</i>	<i>0.85</i>
<i>49.78</i>	<i>0.57</i>
<i>49.78</i>	<i>0.57</i>
<i>60.53</i>	<i>0.45</i>
<i>60.53</i>	<i>0.44</i>
<i>98.91</i>	<i>0.14</i>
<i>98.91</i>	<i>0.14</i>
<i>109.00</i>	<i>0.11</i>
<i>109.00</i>	<i>0.11</i>
<i>119.66</i>	<i>0.09</i>
<i>119.66</i>	<i>0.09</i>

*SISTEMA MODELO CON SACAROSA, pH 3,5.*

*(Sistema E)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.97</i>
<i>0.00</i>	<i>0.97</i>
<i>15.25</i>	<i>0.90</i>
<i>15.25</i>	<i>0.91</i>
<i>21.97</i>	<i>0.82</i>
<i>21.97</i>	<i>0.74</i>
<i>40.33</i>	<i>0.52</i>
<i>40.33</i>	<i>0.53</i>
<i>48.33</i>	<i>0.41</i>
<i>48.33</i>	<i>0.42</i>
<i>58.45</i>	<i>0.26</i>
<i>58.45</i>	<i>0.27</i>
<i>71.78</i>	<i>0.13</i>
<i>71.78</i>	<i>0.14</i>

*SISTEMA MODELO CON Sn (II).*

*(Sistema G)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.97</i>
<i>0.00</i>	<i>0.97</i>
<i>21.88</i>	<i>0.95</i>
<i>21.88</i>	<i>0.95</i>
<i>32.63</i>	<i>0.90</i>
<i>32.63</i>	<i>0.91</i>
<i>61.43</i>	<i>0.90</i>
<i>61.43</i>	<i>0.90</i>
<i>81.10</i>	<i>0.88</i>
<i>81.10</i>	<i>0.88</i>
<i>114.51</i>	<i>0.85</i>
<i>114.51</i>	<i>0.86</i>
<i>166.05</i>	<i>0.79</i>
<i>166.05</i>	<i>0.77</i>

*SISTEMA MODELO CON SORBITOL.*

*(Sistema D)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.97</i>
<i>0.00</i>	<i>0.97</i>
<i>15.25</i>	<i>0.95</i>
<i>15.25</i>	<i>0.95</i>
<i>21.97</i>	<i>0.95</i>
<i>21.97</i>	<i>0.95</i>
<i>71.78</i>	<i>0.95</i>
<i>71.78</i>	<i>0.95</i>
<i>120.91</i>	<i>0.94</i>



**SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5 (AEROBIOSIS).**

*(Sistema A aer)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>10.17</i>	<i>0.96</i>
<i>10.17</i>	<i>0.97</i>
<i>14.00</i>	<i>0.95</i>
<i>14.00</i>	<i>0.96</i>
<i>17.83</i>	<i>0.93</i>
<i>17.83</i>	<i>0.93</i>
<i>22.25</i>	<i>0.90</i>
<i>22.25</i>	<i>0.92</i>
<i>32.62</i>	<i>0.82</i>
<i>32.62</i>	<i>0.86</i>
<i>47.58</i>	<i>0.78</i>
<i>47.58</i>	<i>0.81</i>

**SISTEMA MODELO CON LISINA.**

*(Sistema F)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.95</i>
<i>0.00</i>	<i>0.95</i>
<i>5.07</i>	<i>0.74</i>
<i>12.00</i>	<i>0.55</i>
<i>19.67</i>	<i>0.33</i>
<i>19.67</i>	<i>0.35</i>

**SISTEMA MODELO CON ACIDO PROPIONICO (Sistema H)**

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 n)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>27.90</i>	<i>0.94</i>
<i>27.90</i>	<i>0.96</i>
<i>49.78</i>	<i>0.95</i>
<i>49.78</i>	<i>0.92</i>
<i>60.53</i>	<i>0.94</i>
<i>60.53</i>	<i>0.93</i>
<i>98.91</i>	<i>0.89</i>
<i>98.91</i>	<i>0.87</i>
<i>119.66</i>	<i>0.88</i>
<i>119.66</i>	<i>0.88</i>
<i>142.41</i>	<i>0.85</i>
<i>142.41</i>	<i>0.86</i>

*SISTEMA CON ACIDO FOSFORICO.*

*(Sistema I)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>21.88</i>	<i>0.96</i>
<i>21.88</i>	<i>0.90</i>
<i>32.63</i>	<i>0.92</i>
<i>32.63</i>	<i>0.93</i>
<i>61.43</i>	<i>0.90</i>
<i>61.43</i>	<i>0.89</i>
<i>81.10</i>	<i>0.84</i>
<i>81.10</i>	<i>0.84</i>
<i>114.51</i>	<i>0.78</i>
<i>114.51</i>	<i>0.75</i>
<i>166.05</i>	<i>0.59</i>
<i>166.05</i>	<i>0.64</i>

*SISTEMA MODELO CON GLUCOSA, pH 3,5.*

*(Sistema A)*

*Temperatura: 80 C Sin AAs*

<i>T<sub>po.</sub> (h)</i>	<i>PNE</i>
	<i>T (420 nm)</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>0.00</i>	<i>0.98</i>
<i>18.33</i>	<i>0.96</i>
<i>18.33</i>	<i>0.96</i>
<i>36.45</i>	<i>0.96</i>
<i>36.45</i>	<i>0.96</i>
<i>60.53</i>	<i>0.90</i>
<i>60.53</i>	<i>0.93</i>
<i>98.91</i>	<i>0.88</i>
<i>98.91</i>	<i>0.88</i>
<i>119.66</i>	<i>0.89</i>
<i>119.66</i>	<i>0.88</i>
<i>142.41</i>	<i>0.84</i>
<i>142.41</i>	<i>0.86</i>