

Tesis de Posgrado

Efecto del soluto usado para ajustar la actividad del agua en la cinética de degradación térmica de Tiamina en sistemas modelo

Mauri, Liliana Mabel

1988

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mauri, Liliana Mabel. (1988). Efecto del soluto usado para ajustar la actividad del agua en la cinética de degradación térmica de Tiamina en sistemas modelo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2103_Mauri.pdf

Cita tipo Chicago:

Mauri, Liliana Mabel. "Efecto del soluto usado para ajustar la actividad del agua en la cinética de degradación térmica de Tiamina en sistemas modelo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2103_Mauri.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

República Argentina

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

"EFECTO DEL SOLUTO USADO PARA AJUSTAR LA ACTIVIDAD
DEL AGUA EN LA CINETICA DE DEGRADACION TERMICA
DE TIAMINA EN SISTEMAS MODELO"

2.103
Ej. 2.

Tesis presentada por
LILIANA MABEL MAURI
para optar el título de
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

Director: Dra. Stella Maris Alzamora

AGRADECIMIENTOS

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

Al Departamento de Industrias, al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) y al Departamento de Alimentos de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) por permitir la realización del trabajo experimental en sus instalaciones.

Deseo agradecer especialmente a la Dra. Stella M. Alzamora por su apoyo, ayuda y entusiasmo, que me permitieron concretar este trabajo.

Al Dr. Jorge Chirife por su colaboración y sus valiosos consejos en el desarrollo del mismo.

A la Dra. Josefina M. Tomio por su guía y apoyo.

A los Dres. N. Basualdo y P.A. Carrera por su ayuda en parte de las determinaciones experimentales.

A todos mis compañeros del Departamento de Industrias

///

la ayuda brindada.

A Merck Química Argentina por donar algunas drogas
izadas en este trabajo.

"No se resuelven los problemas científicos golpeándolos
en la cabeza, sino conduciéndolos gradualmente
a un rincón del cual no tengan escape!"

Henry Frank.

INDICE

	página
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCION	3
2.1 Actividad de agua	5
2.2 Estabilidad microbiológica	7
2.3 Preservación de alimentos de alta humedad	16
2.4 Nutrientes	23
2.4.1 Vitaminas	25
2.4.2 Tiamina	28
2.4.3 Estabilidad de la tiamina	32
2.4.3.1 Pre-tratamientos y procesamientos propiamente dichos	33
2.4.3.2 Composición del sistema	36
2.4.3.3 pH y temperatura	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	48
3.1 Sistemas modelo	48

///

3.2	Reactivos utilizados	54
3.3	Preparación de las soluciones	57
3.4	Medición de la actividad de agua	57
3.5	Tratamiento térmico	58
3.6	Determinación de tiamina por el método fluorométrico	59
3.6.1	Reactivos utilizados	61
3.6.2	Fluorómetro	61
3.6.3	Técnica de medición	62
3.6.4	Curva de calibración	63
3.7	Determinación de tiamina por el método microbiológico	65
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	72
4.1	Cinética de la reacción de degradación térmica de tiamina	72
4.1.1	Constante de la velocidad de reacción	72
4.1.2	Energía de activación	106
4.2	Influencia del pH	141

4.3 Influencia de la composición del sistema

5. CONCLUSIONES

6. REFERENCIAS

7. TABLA DE DATOS

APENDICE A

APENDICE B

158

184

187

207

227

233

1. OBJETIVOS

La alta cantidad de humectantes que debe agregarse a los alimentos de humedad intermedia para reducir su actividad de agua (a_w) a niveles que impidan el crecimiento microbiano puede ocasionar cambios adversos en sus características organolépticas. Para evitar este problema se han desarrollado recientemente alimentos estabilizados microbiológicamente a altas humedades, los cuales están preservados por una combinación de factores de "stress" microbianos. Estos factores pueden incluir, entre otros, una moderada reducción de la actividad de agua, control del pH, agregado de aditivos y tratamiento térmico suave. Dichos alimentos se conservan a temperatura ambiente sin necesidad de esterilización o refrigeración y pueden ser consumidos sin rehidratación previa. La combinación de factores de preservación permite utilizar una menor concentración de humectante para lograr la estabilidad microbiológica de los mismos.

Lograda dicha estabilidad microbiológica, es necesario considerar el valor nutritivo de estos alimentos de alta humedad.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de diversos humectantes (NaCl , KCl , Na_2SO_4 , glicerol, sorbitol, propilenglicol, glucosa y sacarosa) en la cinética de degradación de la tiamina en sistemas modelo de actividad de agua reducida

a 0,950, a valores de pH de 4,0 y 5,5 y a temperaturas de procesamiento (80°C, 90°C y 100°C).

Los sistemas modelo están compuestos por clorhidrato de tiamina, buffer fosfato y el humectante estudiado. Los valores de a_w y de pH seleccionados son similares a los usualmente utilizados para preservar alimentos de alta humedad.

2. INTRODUCCION

Los procesos de preservación de alimentos tienen como objetivo primario prolongar la vida útil de los mismos para permitir su almacenamiento y distribución.

Las materias primas como tales o utilizadas en la elaboración de alimentos pueden sufrir numerosos cambios adversos hasta llegar al consumidor. La acción de enzimas, componentes naturales de las mismas, el desarrollo de microorganismos contaminantes y una serie de reacciones físico-químicas pueden producirle severas alteraciones.

Las características organolépticas y el valor nutritivo de los alimentos dependen, entre otros factores, de las operaciones a que se someten las materias primas para su procesamiento y de las condiciones de almacenamiento de las mismas o del producto final.

La investigación, en el área de tecnología de alimentos, está orientada al conocimiento de los fenómenos que ocurren desde la obtención de la materia prima hasta su consumo, para lograr la optimización de las diversas etapas de elaboración en nuevos y/o mejores métodos de preservación. Con el fin de conseguir este objetivo deben tomarse en cuenta tres aspectos fundamenta-

///

les de la calidad de un alimento: el higiénico-sanitario (debe ser inocuo para la salud humana), el nutritivo (relacionado con los nutrientes y antinutrientes presentes en el mismo) y la aceptabilidad del producto (ligada a la percepción psicosenso-rial) (Tannenbaum, 1982).

Lograr la prolongación de la vida útil de un alimento involucra, en muchos de los métodos de preservación, disminuir el contenido de agua del mismo (ya sea por evaporación, como en el secado o en la concentración; por sublimación, como en la liofilización; por inmovilización, como en la congelación; por aumento de la concentración de un determinado soluto en la fase acuosa del alimento, como en el salado, etc.).

El estudio del agua presente en los alimentos y su relación con la estabilidad de los mismos ha sido enfocado a través de distintos criterios: humedad del producto, concentración de solutos, presión osmótica, humedad relativa de equilibrio (HRE) y actividad de agua (a_w) (Troller y Christian, 1978). Algunos de ellos, por ejemplo, el contenido de agua y la concentración de solutos no establecen la naturaleza o el estado del agua en los alimentos, siendo justamente dicho estado el relacionado con el deterioro microbiológico del producto (Reid, 1976). Se ha demostrado que la mejor expresión de la "disponi-

bilidad" del agua para las reacciones microbiológicas de deterioro en los alimentos es el parámetro a_w (Scott, 1953, 1957).

En esta introducción se analizará el concepto termodinámico de actividad de agua y su relación con la estabilidad microbiológica del alimento, para luego describir brevemente las tecnologías de preservación mediante el ajuste de la a_w por el agregado de solutos, y finalmente plantear la necesidad del estudio de la degradación de nutrientes en este tipo de productos.

2.1. Actividad de agua

El término "actividad" debe ser cuidadosamente definido en cualquier aplicación. Cuando se usa la frase "actividad de agua", la palabra "actividad" tiene un significado termodinámico.

En un sistema líquido-vapor de un solo componente, la tendencia de escape de las moléculas se mide en términos de la energía libre de Gibbs (G). En un sistema multicomponente, la tendencia de escape del solvente (componente 1) está dada por su potencial químico, μ_1 .

$$\mu_1 = \left. \frac{\partial G}{\partial n_1} \right)_{T, P, n_2, \dots, n_i} \quad (2.1)$$

///

donde n_i = número de moles de la especie i .

El potencial químico del solvente (agua, en nuestro caso) está dado por:

$$\mu_1 = RT \ln f_1 + A_1 \quad (2.2)$$

siendo f_1 la fugacidad y A_1 una constante que depende de la temperatura.

Para un cambio en la concentración de agua a una dada temperatura:

$$\mu_1 - \mu'_1 = \Delta\mu_1 = RT \ln (f_1/f'_1) \quad (2.3)$$

El concepto de actividad de agua se define como la relación, a una dada temperatura, de la fugacidad, f , de una sustancia en algún estado dado y su fugacidad, f_0 , en algún estado que, por conveniencia, se ha elegido como el estado standard (Lewis y Randall, 1961). Luego, para el estado standard:

$$a^\circ = 1 \quad (2.4)$$

Si referimos la ecuación 2.3 al estado standard:

///

$$\mu_1 - \mu_1^\circ = RT \ln a_1 \quad (2.5)$$

Eligiendo como estado standard el agua pura a presión atmosférica, la actividad de agua, a_w , en cualquier solución es:

$$a_1 \text{ (o } a_w) = f_1 / f_1^{\text{agua pura}} \quad (2.6)$$

En soluciones acuosas y, en particular, en alimentos, a temperatura normal:

$$f_1^{\text{agua pura}} \cong p_1^{\text{agua pura}} \quad (2.7)$$

pues la presión de vapor del agua, p_1 , se aproxima a la de un gas ideal. Luego,

$$a_w = p_1 / p_1^{\text{agua pura}} \quad (2.8)$$

donde p_1 = presión de vapor del agua en la solución (o alimento).

2.2. Estabilidad microbiológica

Como ya se mencionó, la a_w es una medida de la disponi-

///

bilidad del agua necesaria para el crecimiento y desarrollo de las funciones metabólicas de los microorganismos.

Scott (1957) resume las relaciones entre el crecimiento de los microorganismos(m.o.)y la a_w estableciendo que:

1. La a_w determina el límite mínimo de disponibilidad de agua para el crecimiento de los m.o.. El valor de a_w límite por debajo del cual un dado m.o. no puede crecer, considerando los demás factores que afectan el desarrollo en sus valores óptimos (pH, T, O_2 , nutrientes, agentes antimicrobianos, etc.) se conoce como a_w mínimo.
2. Existe cierta adaptación de algunos m.o. a bajas actividades de agua.
3. Cuando la a_w se reduce por el agregado de solutos, estos pueden producir efectos "específicos", que modifican el efecto propio de la a_w .

Si la a_w del medio se reduce por debajo de su valor óptimo, la curva de crecimiento del microorganismo varía: generalmente aumenta la fase "lag", disminuye la pendiente de la fase exponencial y disminuye también a veces el número máximo en la fase estacionaria. A a_w muy bajas la fase "lag" puede hacerse infinita, es decir, cesa el crecimiento (Scott, 1957) o puede ocurrir la muerte del microorganismo.

///

Cuando un microorganismo se encuentra con un medio de a_w reducida se produce una deshidratación osmótica. La magnitud de esta pérdida de agua es directamente proporcional a la diferencia de actividad de agua intra y extracelular (Anagnostopoulos and Dhavises, 1982). Cuando la célula se deshidrata, se detiene el crecimiento. Pero su proceso metabólico continúa, produciéndose una serie de reacciones de "osmoregulación" que dan lugar al incremento de la concentración intracelular de los llamados "solutos compatibles", de tal forma de balancear la osmolalidad externa (Christian y Waltho, 1962 y 1964). En este momento, la célula se rehidrata y el crecimiento continúa. En este proceso de adecuación de la a_w interna, las bacterias acumulan principalmente ácido glutámico, ácido γ -aminobutírico, prolina, K^+ y glucosa; las levaduras acumulan alcoholes polihídricos (algunas también etanol) (Brown, 1974; Gould y col., 1983; Roller and Anagnostopoulos, 1982). Dichos solutos, a grandes concentraciones intracelulares, son compatibles con la actividad enzimática y no actúan como inhibidores de la misma; de allí su denominación.

El mecanismo de osmoregulación celular, en el caso de una reducción de la a_w externa, funciona para mantener la homeostasis con respecto al contenido de agua (Gould y col., 1983).

///

Este proceso de síntesis implica un consumo de energía considerable, disminuyendo en consecuencia la velocidad de crecimiento, ya que la energía disponible para la síntesis celular es menor; este fenómeno explica la menor pendiente de la fase exponencial. Si la a_w externa se reduce a un grado tal de sobrepasar la capacidad de osmoregulación celular, el crecimiento se inhibe.

En la tabla 2.1 se muestran los valores mínimos de a_w para el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras asociados a alimentos, cuando las demás condiciones del medio son óptimas. Cuando estos y otros factores ambientales se desvían de los puntos óptimos para el crecimiento de un microorganismo determinado, disminuye la resistencia del mismo frente a a_w reducidas, aumentando la a_w mínima que permite el crecimiento. Es importante tener en cuenta que la inhibición del desarrollo de los microorganismos no es causada solamente por un decrecimiento en a_w sino también es influenciada por varios factores tales como el pH, flora competitiva, temperatura, presencia o ausencia de oxígeno, etc. (Leistner y Rödel, 1975).

Los valores mínimos de a_w para el crecimiento y producción de toxinas por los varios tipos de C1. botulinum difieren ligeramente siendo el tipo E menos tolerante ($a_w = 0,97$) que los tipos A y B ($a_w = 0,95$). Para inhibir el crecimiento de S. aureus

///

Tabla 2.1 a_w mínima para el crecimiento de microorganismos asociados
con alimentos (Troller y Christian, 1978)

a_w	Bacterias	Levaduras	Hongos
0,98	<u>Clostridium</u> (1), <u>Pseudomonas</u> *	---	---
0,97	<u>Clostridium</u> (2)	---	---
0,96	<u>Flavobacterium</u> , <u>Klebsiella</u> , <u>Lactobacillus</u> *, <u>Proteus</u> *, <u>Pseudomonas</u> *, <u>Shigella</u>	---	
0,95	<u>Alcaligenes</u> , <u>Bacillus</u> , <u>Citrobacter</u> , <u>Clostridium</u> (3), <u>Enterobacter</u> , <u>Escherichia</u> , <u>Proteus</u> , <u>Pseudomonas</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Serratia</u> , <u>Vibrio</u>	---	---
0,94	<u>Lactobacillus</u> , <u>Microbacterium</u> , <u>Pediococcus</u> , <u>Streptococcus</u> *	---	---

Continuación Tabla 2.1

a_w	Bacterias	Levaduras	Hongos
0,93	<u>Lactobacillus*</u> , <u>Streptococcus</u> , <u>Vibrio*</u>		<u>Rhizopus</u> , <u>Mucor</u>
0,92		<u>Rhodotorula</u> , <u>Pichia</u>	---
0,91	<u>Corynebacterium</u> , <u>Staphylococcus</u> , ⁽⁴⁾ <u>Streptococcus</u>		---
0,90	<u>Micrococcus</u> , <u>Pediococcus</u>	<u>Saccharomyces</u> , <u>Hansenula</u>	
0,88		<u>Candida</u> , <u>Torulopsis</u>	<u>Cladosporium</u>
0,87	---	<u>Debaryomyces</u>	---

Continuación Tabla 2.1

a_w	Bacterias	Levaduras	Hongos
0,86	<u>Staphylococcus</u> (5)	---	---
0,85	---		<u>Penicillium</u>
0,75	Bacterias halófilas	---	---
0,65		---	<u>Aspergillus</u>

*Algunas cepas

(1) Clostridium botulinum tipo C

(2) Clostridium botulinum tipo E Y algunas cepas de Clostridium perfringens

(3) Clostridium botulinum tipo A Y B Y Clostridium perfringens

(4) Anaeróbico

(5) Aeróbico

se necesita una $a_w = 0,91$ en condiciones anaeróbicas y una $a_w = 0,86$ en condiciones aeróbicas. Por debajo de $a_w = 0,86$ ya no hay posibilidad de crecimiento de bacterias con excepción de las halófilas. Hongos y levaduras pueden crecer a valores de a_w sensiblemente menores que las bacterias, por ejemplo, en el rango 0,65-0,80.

Los límites de a_w para la producción de toxinas son sensiblemente superiores a los correspondientes al crecimiento y la producción de toxinas es muy afectada por otros factores, tales como el pH. Por ejemplo, el S. aureus tiene su límite de crecimiento, en condiciones aeróbicas, a $a_w = 0,86$, pero no produce toxina si la a_w es menor a 0,89. Por otra parte, varios hongos xerofílicos son capaces de producir toxinas. La producción de micotoxinas se produce a a_w comprendidas entre 0,85-0,93 (Troller y Christian, 1978) y es improbable a valores menores de 0,83 (Northolt y col., 1976).

Del análisis de estos datos surge que, en la formulación de métodos de preservación basados en el control de la a_w , un valor límite de seguridad para muchos alimentos es 0,95, ya que por encima del mismo puede haber crecimiento y producción de toxina por el Clostridium botulinum. Otros microorganismos patógenos, por ejemplo, el Staphylococcus aureus pueden crecer a a_w

///

mucho más bajas, pero el crecimiento de este microorganismo es fácilmente controlable por reducción de pH, tratamiento térmico suave y otros factores de preservación (Notermans y Heuvelman, 1983; Robach y Stateler, 1980).

El primer objetivo de cualquier proceso de preservación de alimentos es lograr la estabilidad microbiológica de los mismos. Una vez controlada esta forma de deterioro es necesario considerar el desarrollo de otras reacciones adversas que pueden tener lugar tanto en las operaciones de pre-procesamiento como en la de procesamiento propiamente dicho o de posterior almacenamiento.

Es por lo tanto imprescindible tener en cuenta también tanto la estabilidad enzimática como la físico-química del alimento en las etapas mencionadas. Los efectos del agua sobre las reacciones químicas y enzimáticas en los alimentos son más complicados que sus efectos sobre el crecimiento microbiano. La actividad de agua no es el único parámetro que define los límites de la actividad química. El agua puede actuar en una o más de las siguientes funciones: a) como solvente de reactivos y productos; b) como un reactivo (por ejemplo en las reacciones de hidrólisis); c) como producto de reacciones (por ejemplo en reacciones de condensación, como en el pardeamiento no enzimático);

y d) como un modificador de las actividades catalíticas o inhibitorias de otras sustancias (por ejemplo el agua inactiva algunos catalizadores metálicos de la peroxidación de lípidos).

2.3. Preservación de alimentos de alta a_w

Es cada vez mayor la necesidad de contar con alimentos procesados y preservados, nutritivos y estables durante el almacenamiento y que pueden ser distribuidos con seguridad hasta llegar al consumidor en buenas condiciones.

Así se ha producido una rápida expansión de la industria de alimentos congelados, pero su éxito depende de la existencia de una adecuada cadena de distribución. Este problema no lo presentan los alimentos deshidratados.

Sin embargo en estos últimos se observan otros inconvenientes, por ejemplo: falta de recuperación de la textura del material original, desarrollo de reacciones de deterioro durante el procesamiento y almacenamiento (pardeamiento no-enzimático, desarrollo de "off-flavors", oxidación de lípidos, etc.) pérdida del grado de rehidratación en agua y pérdida del valor nutritivo.

En la actualidad, en lugar de buscar productos estables a través de una gran remoción de agua, se centra el interés en el

desarrollo de alimentos en los que, con la mínima disminución en su cantidad de agua "disponible", se evite el deterioro microbiano. Para disminuir el agua libre presente en los alimentos se ha propuesto el agregado de solutos, también llamados humectantes. Cuando los solutos se disuelven en agua, la entropía del sistema disminuye porque las moléculas de agua se orientan con respecto al soluto. El agua tiene menor libertad de escapar a la fase vapor y a consecuencia de ello, disminuye la presión de vapor. Este concepto es la base de la teoría de disminución de la a_w por agregado de humectantes.

Toda esta metodología dió lugar al desarrollo de los llamados "alimentos de humedad intermedia" (AHI). Por lo anteriormente expuesto resultan plásticos, fácilmente masticables, no se producen o son mínimos los cambios estructurales que afectan la textura, pueden ser consumidos sin rehidratación previa, no producen la sensación bucal de secado y además son estables sin refrigeración o proceso térmico (Potter, 1970; Kaplow, 1970; Brockman, 1970; Labuza y col., 1970). Estos alimentos, que tienen una humedad expresada en base seca del 20 al 50% (lo que se traduce en valores de a_w en el rango 0,70-0,85), son considerados como uno de los más recientes avances en la preservación de alimentos (Davies y col., 1976).

///

Sin embargo se debe reconocer que la elaboración de productos estables por la incorporación de solutos y/o deshidratación parcial hasta esos niveles de a_w ha sido practicada por años y es el método de preservación aplicado para muchos alimentos bien conocidos. Ellos son los que podríamos llamar AHI históricos o tradicionales. Incluyen aquellos secados sin el agregado de humectantes (ciruelas, damascos, higos, duraznos, pasas de uva, dátiles, etc.), los preservados por adición de azúcar (frutas confitadas o garrapiñadas, compotas, jaleas, almíbares, pasteles rellenos), aquellos que han sido secados con el agregado de azúcar y/o sal (jamón de campo, pescados salados, embutidos crudos) y productos de panadería (tortas de frutas, pasteles rellenos con fruta). Pero es a partir de los años sesenta que se desarrolla la base científica de la formulación de alimentos a través del mezclado de ingredientes o incorporación de humectantes para conseguir una a_w que permita un almacenamiento seguro. Los modernos AHI tuvieron su mayor desarrollo inicial con la producción de alimentos blandos para animales y los formulados para fines especiales, como los destinados al ejército o vuelos espaciales.

Debe considerarse que la cantidad de soluto/s necesaria para reducir la a_w del alimento a los valores de los AHI es dema-

///

siado grande (Benmergui y col., 1979; Chirife y col., 1980; Chirife y Ferro Fontán, 1980). De allí surge uno de los principales problemas en los mismos: el cambio de las características organolépticas del alimento original. Este cambio es el que afecta negativamente el "flavor", lo que se traduce en una falta de aceptación a nivel de consumo humano. A pesar de su estabilidad microbiológica, los AHI están expuestos también a otras reacciones de deterioro. Entre ellas: reacciones catalizadas por enzimas, pardeamiento no-enzimático, pérdida de nutrientes, oxidación de lípidos y otras reacciones producidas por radicales libres, etc. Entonces se podría concluir que la pérdida de palatabilidad así como el desarrollo de cambios químicos adversos, tanto desde el punto de vista organoléptico como nutritivo, explica la razón por la cual no ha tenido éxito el desarrollo de nuevos A.H.I. (Troller y Christian, 1978).

Dentro de esta nueva tecnología, la forma de evitar las desventajas mencionadas se halló en la posibilidad de desarrollo de un nuevo grupo de productos alimenticios de mayor a_w y contenido de humedad que los típicos A.H.I., los que fueron introducidos como "alimentos de alta humedad" (A.H.A.) (Sperber, 1983). En dichos alimentos se logra estabilidad combinando una reducción moderada de la a_w , en el rango 0,90 a 0,95, con el control de

otros factores de "stress" microbianos (pH, agentes químicos de preservación permitidos, cantidad de oxígeno disponible, tratamiento térmico suave, etc.). Es bien sabido que el mecanismo de osmoregulación celular involucra un costo considerable de energía para la síntesis o acumulación de los llamados "solutos compatibles" cuando se disminuye la a_w (Gould y col., 1983). Entonces cualquier restricción en el suministro de energía tenderá a ser especialmente sinérgico con la reducción de la a_w cuando se usa como método de preservación.

Estos nuevos alimentos tienen como características principales, además de la estabilidad microbiológica, su buena palatabilidad (Leistner y col., 1981).

Las técnicas en desarrollo para la producción de este tipo de productos pueden clasificarse en (Karel, 1976):

- 1- Infusión húmeda, en la cual trozos sólidos del alimento son remojados y/o cocidos en una solución apropiada para dar un producto final que tenga el nivel deseado de a_w .
- 2- Infusión seca, en la que los trozos sólidos del alimento son deshidratados primero y seguidamente se realiza la infusión remojándolos en una solución que contenga el o los humectantes deseados.
- 3- Mezclado, en la cual los componentes son pesados, mezclados, cocidos y sometidos a extrusión o combinados de alguna otra manera

///

para que den un producto final de a_w deseada.

Estos procedimientos pueden incluir, además, otros tratamientos, tales como: 1) ajuste de la a_w en el producto terminado por deshidratación o evaporación, 2) estabilización microbiológica parcial por calentamiento o uso de aditivos químicos, 3) inhibición del deterioro enzimático por escaldado, 4) prevención del deterioro físico y químico por adición de antioxidantes, quelantes, emulsificantes o estabilizantes y 5) inclusión de nutrientes apropiados.

Recientemente se ha reportado en la literatura (Fox, 1980; Sajur, 1985; Kanterewicz, 1985) el desarrollo de nuevos procesos de conservación de alimentos a partir de los siguientes factores: 1) reducción de la a_w por agregado de alcoholes polihídricos, azúcares y/o sal; 2) retardo del crecimiento microbiano por adición de agentes antimicrobianos y fundamentalmente antimicóticos, como ácido sórbico, benzoico, propiónico, etc y 3) reducción ligera del pH del alimento, que sea compatible con sus características organolépticas. Todos estos factores combinados, con la inclusión o no de un tratamiento térmico suave, permiten la estabilidad microbiológica en el rango mencionado de a_w (0,90-0,95).

La calidad de un alimento en dicho rango de a_w puede

///

modificarse también por algunas reacciones de deterioro. En particular, a estas altas a_w , tienen especial importancia el pardeamiento no enzimático (p.e. reacción de Maillard) y la degradación de nutrientes. Las investigaciones publicadas sobre la relación de estas reacciones con los factores que las afectan están referidas fundamentalmente al rango de a_w de los A.H.I.. Recientemente se han empezado a realizar algunos estudios sobre evaluación de la calidad nutritiva y organoléptica de alimentos a valores de a_w mayores de 0,90 (Fox y col., 1982, 1983; Petriella y col. 1985; Cerrutti y col., 1985; Buera, 1986), pero las investigaciones sobre este tema son todavía escasas.

Para encarar, entonces, el desarrollo de alimentos microbiológicamente estables en el rango de a_w 0,90-0,95, es necesario estudiar la estabilidad química de los mismos. Uno de los puntos a considerar en este tipo de evaluación está referido al aspecto nutricional, o sea al estudio de la degradación de nutrientes, bajo diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento, en el rango de a_w de interés.

El objeto de esta tesis, por los motivos expuestos en esta primera parte de la introducción, está orientado al estudio de la pérdida de nutrientes, y dentro de ellos, de una de las vitaminas más inestables, la tiamina, en condiciones de procesamiento.

///

2.4. Nutrientes

Las primitivas formas de vida eran presumiblemente organismos simples del tipo de las bacterias, capaces de sintetizar todas las moléculas necesarias para su crecimiento y reproducción a partir de las sales, compuestos simples de carbono, nitrógeno y agua (Munro, 1969).

Hace alrededor de un billón de años se desarrollaron los primeros animales unicelulares, que diferían de las células vegetales en su necesidad de obtener varios compuestos de carbono del entorno. Todos los animales necesitan digerir compuestos orgánicos. En términos de sus requerimientos nutricionales, es como si todos los animales sufrieran de un error en su metabolismo, o una enfermedad hereditaria, a la cual las plantas son inmunes.

Una serie de cambios genéticos, que produjeron una dependencia de las fuentes de alimentos, han influenciado el curso de la evolución y desarrollo de los animales. Además, en relación con las fuentes exógenas de los nutrientes esenciales, se produjo el desarrollo de deficiencias nutricionales específicas. Tales deficiencias afectaron la salud de generaciones anteriores y continúan afectando las vidas de muchas poblaciones en todo el mundo actual (Beaton y Bengoa, 1976).

En vista de la rápida expansión de la población y de la importancia de mantener un balance entre ella y el suministro de alimentos, tanto como de las tendencias en las regiones técnicamente desarrolladas hacia el uso de alimentos altamente procesados, es importante estudiar el mantenimiento y optimización de los niveles de nutrientes en dichos alimentos.

El término "nutrientes" comprende, en el sentido químico, los componentes puros de la alimentación, con los cuales los seres vivos mantienen un funcionamiento celular normal. Los nutrientes se utilizan así en el crecimiento, mantenimiento, reparación tisular y reproducción, y los alimentos son el vehículo para ellos. Un alimento en particular puede contener sólo unos pocos nutrientes, o puede aportar varios, pero ningún alimento solo provee todos los nutrientes en la cantidad y las proporciones necesarias para mantener una adecuada salud (Hegsted y Ausman, 1973).

Los nutrientes comprenden: hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales. Las primeras tres clases sirven como fuente de energía. Están relacionadas tanto con los procesos de transformación de energía como con los de formación de estructuras. El agua y las sustancias minerales pueden cumplir funciones estructurales o actuar como cofactores o reguladores metabólicos.

///

Las vitaminas no suministran energía ni intervienen como unidades estructurales, pero son necesarias para el desarrollo de ambos procesos.

Existen entre 45 y 50 nutrientes, entre los constituyentes de la dieta, considerados "esenciales" para el hombre, dada su incapacidad de sintetizarlos. Entre ellos una serie de minerales, aminoácidos y ácidos grasos, así como la mayoría de las vitaminas.

2.4.1. Vitaminas

Las vitaminas son nutrientes orgánicos imprescindibles en pequeñas cantidades para el normal funcionamiento celular, siendo incapaces de ser sintetizadas por los seres humanos.

Antes de que se aislara en forma pura cualquier vitamina, se las clasificó en "lipo-solubles A" y en "hidro-solubles B" (Mc. Collum y Davis, 1913). El factor antiescorbuto, que se detectó después, se conoció como vitamina C, y a medida que se conocían nuevas vitaminas se las nombró con las letras del alfabeto. La "vitamina B" resultó ser una mezcla compleja de la que se aislaron por lo menos ocho compuestos. Para diferenciarlas se usaron subíndices numéricos. Actualmente este sistema está siendo reemplazado por una nomenclatura que tiene como base la naturale-

za del compuesto, o una descripción de su origen o de las funciones en que intervienen. Se mantiene actualmente la división de las vitaminas en dos grupos principales: vitaminas lipo-solubles e hidro-solubles.

1- Vitaminas lipo-solubles:

Vitamina A	Comprende: Vitamina A, aldehídica (retinal) Vitamina A, enólica (retinol) Vitamina A ₂ (3-dehidroretinol)
Vitamina D	Comprende: Vitamina D ₂ (ergocalciferol) Vitamina D ₃ (colecalfiferol)
Vitamina E	Comprende: α-tocoferol β-γ-δ-tocoferoles tocotrienoles
Vitamina K	Comprende: Vitamina K ₁ (fitonadiona) Vitamina K ₂ (menaquinona; farnoquinona) Vitamina K ₃ (menadiona, (sintética))

///

2- Vitaminas hidro-solubles:

Vitamina C Comprende: ácido ascórbico o su forma
oxidada, ácido dehidroascórbico

Vitamina B

Dentro de las vitaminas B reconocidas como nutricionalmente importantes se encuentran:

- 1- Tiamina (vitamina B₁)
- 2- Riboflavina (vitamina B₂)
- 3- Niacina (vitamina B₅)
- 4- Vitamina B₆ (piridoxina, piridoxal y piridoxamina)
- 5- Acido pantoténico (vitamina B₃)
- 6- Biotina (vitamina H)
- 7- Folacina (grupo del ácido fólico, vitamina M o B_C)
- 8- Vitamina B₁₂ (cobalamina)

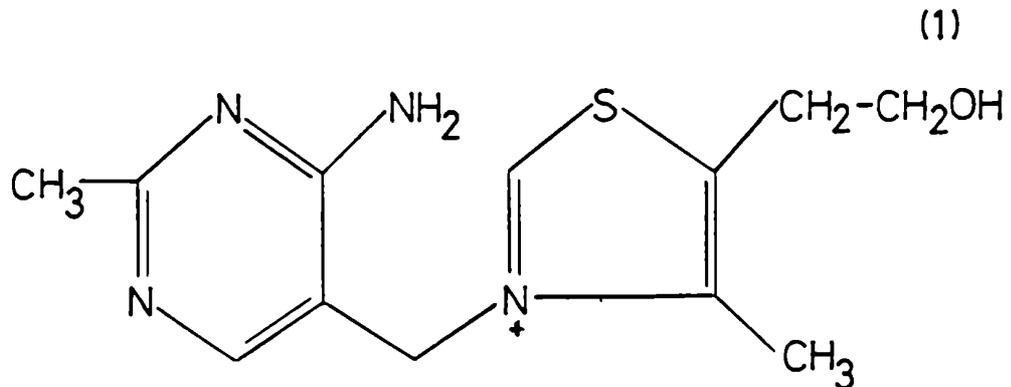
Además de las vitaminas mencionadas existen otras sustancias activas con propiedades afines como el ácido lipoico, el inositol, la carnitina, los flavonoides y la colina, sobre las cuales existen controversias en cuanto a su consideración como vitaminas.

///

2.4.2. Tiamina

Esta vitamina ha recibido distintos nombres: vitamina B₁, oryzamina, torulina, polyneuramina, vitamina F, vitamina antineurítica, factor antiberiberi. Actualmente los nombres aceptados son: tiamina, en Estados Unidos y aneurina, en Europa.

La tiamina (C₁₂H₁₇N₄OS) es la 2,5-dimetil-6-aminopiridina, unida a través de un enlace metilénico con el 4-metil-5-hidroxietiltiazol:

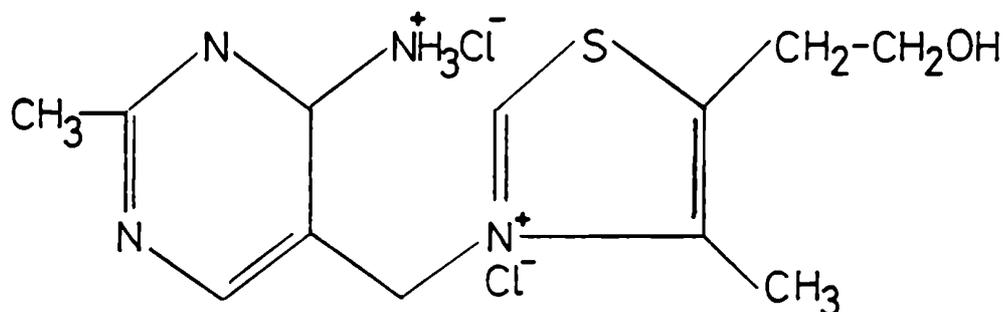


Puede existir en los alimentos en diversas formas, entre ellas, como tiamina libre, como tiamina monofosfato [si (1) es -CH₂-O-

///

PO_3H_2], como tiamina pirofosfato o cocarboxilasa [si (1) es $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}-\text{PO}_3\text{H}_2$] y unida a la respectiva apoenzima.

Esta vitamina fue obtenida en estado cristalino en 1926 por Jansen y Donath. Generalmente se la aísla en la forma de clorhidrato de cloruro de tiamina:



El pirofosfato de tiamina participa como coenzima en los siguientes sistemas (Metzler, 1960):

- 1- α -cetoácido descarboxilasas
- 2- α -cetoácido oxidasas
- 3- transcetolasa
- 4- fosfocetolasa

///

Además existen múltiples evidencias de que la tiamina tiene un papel específico en neurofisiología, independiente de su función como coenzima. De manera que es importante para la evaluación de los efectos fisiológicos de la vitamina considerar sus múltiples relaciones con el sistema neuroendocrino. La sintomatología producida por deficiencia de tiamina afecta primeramente al sistema nervioso, con distintos cuadros según la edad y estado de la persona.

El beriberi, nombre de la enfermedad que desencadena esta avitaminosis, presenta tres formas en el adulto: la forma seca del beriberi, la forma hidrópica y la forma perniciosa aguda o beriberi fulminante, pudiendo ocurrir la muerte a través de las dos últimas. Una forma menos frecuente del beriberi es la encefalopatía de Wernicke, que produce la muerte en sus fases más tardías. Se debe mencionar también que existe una sintomatología característica por falta parcial o transitoria de la tiamina (hipovitaminosis). Los síntomas generales son: cansancio, inapetencia, falta de fuerza muscular, pérdida de peso y de memoria y trastornos gastrointestinales, además de síntomas neuróticos.

Por lo tanto el hombre necesita una fuente alimenticia de tiamina para suplir sus necesidades diarias, que oscilan entre

1,4mg (para hombres de 23 a 50 años) y 1,0mg (para mujeres del mismo rango de edad). Para mujeres embarazadas y en período de lactancia la ingesta debe aumentarse 0,3mg. Los niños deben recibir 0,3 a 0,5mg diarios, y cuando tienen más de 10 años 0,7 a 1,2mg diarios (Food and Nutrition Board, 1974). El requerimiento diario depende de la edad, la situación metabólica, la magnitud de la síntesis propia por las bacterias de la flora intestinal y la presencia en la dieta de enzimas que la degradan, así como la ingesta de proteínas y carbohidratos o lípidos.

La tiamina no se acumula en el cuerpo humano en cantidades altas. Las mayores concentraciones se encuentran en el músculo esquelético, corazón, hígado, riñones y cerebro. Se considera que aproximadamente el 50% de la tiamina total está distribuida en los músculos (Shimazono y col., 1965).

Los alimentos más ricos en esta vitamina son: levadura de cerveza y gérmenes de arroz, trigo, maíz y centeno. Todos los tipos de carne son buena fuente de tiamina, siendo la de cerdo especialmente abundante. El hígado y los riñones contienen más tiamina que la carne. Otras fuentes importantes de esta vitamina son: maíz, harina y pan integral, salvado de trigo, legumbres, frutas secas y yema de huevo. En los cereales aparecen concentraciones relativamente altas en su forma libre, y como

pirofosfato de tiamina o complejo proteico en levaduras y tejidos animales principalmente.

De acuerdo con datos de bibliografía (U.S.D.A., 1963; Documenta Geigy, 1965), la mayoría de los alimentos tienen una concentración de tiamina entre 0,20 y 1µg/g, salvo los de mayor contenido (≈4-10µg/g). La concentración usada para el desarrollo de este trabajo fue de 1µg/g.

La tiamina es una de las vitaminas hidrosolubles más inestables y son numerosos los factores que afectan su estabilidad (Farrer, 1955).

2.4.3. Estabilidad de la tiamina

El efecto del procesamiento y almacenamiento de los alimentos sobre la estabilidad de las vitaminas ha sido revisado extensamente en años recientes (Labuza, 1972; Salunkhe, 1974; Harris y Karmas, 1975; Lund, 1975; Tannenbaum, 1979; Kirk, 1981; Schwartzberg, 1982; Thompson, 1982). Algunos autores han estudiado los mecanismos químicos responsables de los cambios en el contenido de vitaminas. Muchos trabajos incluyen sólo información cualitativa o semicuantitativa porque reportan únicamente valores iniciales y finales de vitamina después de un dado proceso y/o almacenamiento (Tannenbaum, 1979; Harris y Karmas, 1975).

///

Por lo tanto, las predicciones a partir de estos datos son difíciles o imposibles de hacer. Otros investigadores han realizado una aproximación cinética del fenómeno de pérdida de vitaminas (Labuza, 1972; Kirk, 1981; Thompson, 1982). Kirk (1981) y Labuza (1972) han recapitulado los parámetros cinéticos que describen los cambios en tiamina durante el secado y almacenamiento de alimentos y sistemas modelo de baja a_w ($a_w \leq 0,70$).

El propósito de este punto es recopilar la información disponible sobre los aspectos químicos y cinéticos de pérdida de tiamina en alimentos de alta humedad. Se mencionará en primer lugar la influencia de algunos pre-tratamientos y procesamientos y en segundo lugar se tratará en particular los efectos que tienen la composición del sistema, el pH, la temperatura y la a_w en la degradación de la tiamina.

Estos últimos "parámetros" nos interesan especialmente desde el punto de vista del desarrollo de los A.H.A., ya que son variables que se pueden controlar en la formulación de los mismos.

2.4.3.1. Pre-tratamientos y procesamientos propiamente dichos

La historia del alimento desde la cosecha o la muerte hasta el momento del procesamiento, causa considerable variación

///

en su valor nutricional. Estas manipulaciones pueden ocasionar pérdidas importantes de tiamina.

Una de las vías más significativas de pérdida de nutrientes hidrosolubles es a través de la extracción o difusión al medio. Las operaciones en el procesado de alimentos que llevan a pérdidas de este tipo incluyen lavado, transporte a través de canales, escaldado, cocción, etc. La naturaleza y grado de la pérdida dependerá del pH, la temperatura, la relación agua-alimento, la relación superficie-volumen del alimento, la agitación del medio, etc. De las operaciones mencionadas, el escaldado en agua es la que lleva a las pérdidas más importantes. Una revisión sobre este tema, incluyendo los métodos de escaldado y la influencia del tiempo y la temperatura a las que se realiza, fue publicado por Lee (1958). Hough y Alzamora (1984) y Alzamora, Hough y Chirife (1985) estudiaron la pérdida de tiamina durante el escaldado de arvejas a distintas temperaturas y en diferentes condiciones externas de transferencia de calor (vapor, agua en convección natural o forzada). Concluyeron que las pérdidas debido a destrucción térmica son despreciables y que fundamentalmente las mismas deben atribuirse a difusión en el medio de escaldado. Además, encontraron que la retención es mayor a altas temperaturas en agua "estática" y que las pérdidas

son menores cuando el tamaño de la arveja se incrementa: a mayor tamaño mayor es la retención.

El dióxido de azufre, sulfitos o bisulfitos, empleados para evitar fundamentalmente el pardeamiento no enzimático pero también el enzimático de frutas y vegetales, escinden la molécula de tiamina (Metzler, 1960), debido a la alta nucleofiliidad del anión HSO_3^- , provocando importantes pérdidas de la misma en los vegetales así tratados. La química de la ruptura por sulfito ha sido extensamente estudiada por Leichter y Joslyn (1969).

Los óxidos de etileno y propileno, usados en la industria alimentaria como esterilizantes de especias principalmente, pueden dar compuestos que reaccionan con la tiamina ocasionando su pérdida (Tannenbaum, 1982).

En el caso de los granos, debe mencionarse la operación de molienda, dado que el mayor contenido de esta vitamina se encuentra en las capas externas y en el germen. Las harinas tienen menor contenido de tiamina, así como de otras vitaminas y minerales, cuanto mayor es el grado de extracción (Aykroyd y Doughty, 1970).

Aquellos procesamientos que incluyen tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización) llevan asociados pérdidas

de tiamina, que dependerán de la relación tiempo-temperatura empleada en los mismos y, dependiendo del proceso, pérdidas importantes en el líquido de cocción. Estas consideraciones no pueden estar disociadas del análisis del efecto de la temperatura sobre la pérdida de tiamina, el cual será considerado en el punto 2.4.3.3. de esta introducción.

2.4.3.2. Composición del sistema

Existen distintos compuestos, presentes en el alimento o agregados al mismo, que modifican la estabilidad de la tiamina. Entre los mismos se encuentran:

- Proteínas y aminoácidos. Mc Intire y Frost (1944) han informado que los α y β -aminoácidos parecen ejercer un efecto protector sobre la tiamina. Sin embargo, bajo condiciones alcalinas, algunos aminoácidos, como glicina, α -alanina, β -alanina, etc., inducirían la ruptura de la tiamina (Kurata y col., 1968). Se conoce que las proteínas aumentan la estabilidad de esta vitamina (Dwivedi y Arnold, 1973).
- Aldehidos, aminas, ésteres. Algunos de estos compuestos reaccionan con la tiamina, pero la forma en que se producen estas reacciones en productos alimenticios es difícil de dilucidar, dada la complejidad de los mismos. Oka y col. (1970) han infor-

///

mado en particular que la tiamina y sus homólogos son destruidos por aldehidos aromáticos.

-Hidratos de carbono. Lhoest (1957) y Lhoest y col. (1958) han descrito la reacción de la tiamina con glucosa como una reacción del tipo Maillard. Van der Poel (1956) ha reportado que, al calentar una solución de tiamina y glucosa, se produce color marrón y fluorescencia. Este comportamiento es análogo a las reacciones de Maillard entre azúcares y aminoácidos, y puede ser importante en la pérdida de vitamina durante el procesamiento. Wai y col. (1962) encontraron reducción de la actividad de la tiamina en preparaciones vitamínicas que contienen dextrosa, mientras que las pérdidas de tiamina en presencia de sustancias tales como sacarosa y manitol (no reductoras) no son notables durante cierto período de almacenamiento. Doyon y Smyrl (1983) demostraron el incremento que produce la presencia de azúcares reductores (xilosa, glucosa, maltosa) sobre la velocidad de degradación de esta vitamina en solución.

-Compuestos inorgánicos. De acuerdo con datos de literatura parece importante la influencia de ciertas sustancias inorgánicas sobre la velocidad de degradación de la tiamina.

Esta vitamina es inactivada por el nitrito, posiblemente a través de la reacción con el grupo amino del anillo

pirimidínico (Beadle y col., 1943). El nitrito se usa como agente preservador en carnes y puede agregarse como tal o formarse como reducción microbiana del nitrato. Algunos vegetales que contienen alta concentración de nitrato, como espinaca y remolacha, también pueden contener nitritos a causa de la actividad microbiana.

Booth (1943) fue el primero en reconocer la influencia de los iones Cu^{++} en la destrucción de la tiamina. Farrer (1947) mostró que los metales pesados aceleran esa destrucción formando iones complejos con los constituyentes del medio. Otros compuestos inorgánicos, como bicarbonato de sodio, borato, tiosulfato, acetato, fosfato monoácido y fosfato diácido de potasio, parecen actuar como aceleradores de la destrucción de la tiamina (Watanabe y Marui, 1949).

-Factores antitiamínicos. Existen en los alimentos enzimas específicas, cuya acción reduce la actividad biológica de la tiamina. Ellas son la tiaminasa I (presente en las vísceras de pescados de agua dulce y mariscos, en el Bacillus thiaminolyticus y en el Clostridium thiaminolyticus) y la tiaminasa II (presente en microorganismos como el Bacillus aneurinolyticus y la Candida aneurinolytica). También pueden encontrarse compuestos antitiamínicos termoestables, relacionados con el ácido tánico y el

///

cafeico (en verduras y otros productos vegetales), y con la mioglobina, hemoglobina y hemina (en tejidos animales) (Wood, 1984).

- Compuestos resultantes de reacciones de alteración. Los productos de oxidación de lípidos, como los hidroperóxidos, y las reacciones de pardeamiento no enzimático originan compuestos carbonilo altamente reactivos que dan lugar a posteriores pérdidas de tiamina (Archer y Tannenbaum, 1976).
- Forma en que se encuentra la vitamina. Se mencionó que la tiamina puede estar presente como tiamina libre, éster pirofosfórico o unida a proteínas. Estas formas presentan diferente estabilidad, como la menciona Farrer (1955). Por otra parte, distintas sales de esta vitamina (por ejemplo cloruro, nitrato), presentan también diferencias en su reactividad (Hollenbeck y Obermeyer, 1952; Labuza y Kamman, 1982).
- Humectantes. Corrientemente, se usan tres clases generales de compuestos como humectantes en la industria alimentaria: los polioles (propilenglicol, polietilenglicol 400, glicerol y sorbitol), los azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y jarabe de maíz) y las sales (NaCl y KCl).

Los datos cinéticos existentes en literatura sobre la influencia de estas sustancias en la pérdida de tiamina son es-

///

casos. Fox y col. (1982) determinaron las constantes de degradación a temperaturas de procesamiento (84 °C y 94 °C) en sistemas modelo de pH 3,0; 5,0 y 7,0, a distintos valores de a_w (0,90; 0,93; 0,96 y 1,00), ajustado mediante el agregado de glicerol. De sus resultados se desprende la marcada influencia del pH, así como de la temperatura. Asimismo se concluye que el efecto de la a_w sobre la estabilidad de la tiamina es despreciable en el rango estudiado durante el proceso térmico.

Recientemente Arabshahi y Lund (1988) estudiaron la estabilidad de la tiamina en alimentos simulados de humedad intermedia. Lo hicieron en función de la temperatura (25 °C a 60 °C) y de la a_w (0,15 a 0,85), ajustada con el agregado de propilenglicol, glicerol o polietilenglicol 400. Analizaron también la influencia del oxígeno, la riboflavina y la niacina sobre la velocidad de degradación, comprobando que dichos compuestos no afectan la misma. Respecto del efecto de los humectantes analizados, encontraron que la velocidad de pérdida de tiamina en sistemas conteniendo polietilenglicol 400 es significativamente mayor que en sistemas con glicerol y atribuyeron dicho efecto al cambio de polaridad del medio de reacción.

La selección del o de los humectantes a usar es uno de los puntos más importantes a tener en cuenta en la formulación de los A.H.A.. En esa elección de soluto/s más adecuados para

///

lograr la estabilidad del alimento, además del factor a_w , deberán considerarse solubilidad, estabilidad, textura, impacto al sabor, costo, límite fisiológico, etc., así como su influencia en la calidad nutricional del mismo.

De los trabajos existentes no se puede establecer si la presencia de determinados humectantes tiene efecto sobre la retención de tiamina en el rango de a_w que interesa en este estudio. Así, se propone realizar una evaluación de alguno de los solutos mencionados desde el punto de vista de su incidencia en la degradación de la tiamina. De acuerdo con lo expuesto, los humectantes elegidos han sido: glucosa, sacarosa, glicerol, propilenglicol, cloruro de sodio, cloruro de potasio y sulfato de sodio (este último con fines de comparación con las otras dos sales empleadas).

2.4.3.3. pH y temperatura

Estos son los principales factores estudiados en la literatura en relación a la destrucción de la vitamina. Su influencia ha sido reportada tanto en alimentos como en sistemas modelo y dentro de una amplia variedad de condiciones operativas (Farrer, 1941; Mulley y col., 1975a y b; Fox y col., 1982; Mauri, 1984; Arabshahi y Lund, 1988).

///

La disminución de la estabilidad de la tiamina al aumentar el pH fue planteada por Jansen (1926) al introducir el método del tiocromo para su determinación. Metzler (1960) y Dwivedi y Arnold (1972) han identificado diversos compuestos de degradación de la tiamina, según sean los valores de pH y temperatura.

Booth (1943) estudió la influencia del pH sobre la degradación de tiamina, en soluciones de distintos buffers (ftalato, fosfato y ftalato-fosfato) a 100 °C, sin realizar un tratamiento cinético de los datos. A través de sus resultados concluyó que la destrucción de la tiamina a dicha temperatura se debe a un proceso de degradación térmica, afectado por el pH, aumentando la estabilidad de la vitamina al disminuir dicho parámetro dentro del rango estudiado (2,4-7,4).

Farrer (1945, 1947) estudió la velocidad de degradación térmica de la tiamina en los siguientes buffers: fosfato-ácido cítrico, fosfato-borato, borato-ácido succínico, fosfatos y fosfato-ftalato, trabajando también a 100 °C. Interpretando los resultados obtenidos a través de una cinética de primer orden, demostró en primer lugar que los valores de las constantes de velocidad en todos los casos son inversamente proporcionales a la concentración de H^+ , y en segundo lugar que la magnitud de

este efecto depende de la naturaleza de las sales de buffer presentes. Es decir que para predecir el comportamiento de la tiamina al someterla a ebullición en una dada solución, es necesario conocer no sólo el pH sino también las sales del buffer que lo controlan.

Feliciotti y Esselen (1957) estudiaron la influencia del pH (entre 3,5 y 7,0) sobre la velocidad de pérdida de tiamina a altas temperaturas (109 °C a 149 °C), en soluciones acuosas de buffer fosfato y en purés de carnes y de vegetales. En todos los casos hallaron un incremento de la constante de velocidad con el aumento del pH del sistema.

Mulley y col. (1975b) obtuvieron las constantes de velocidad para la degradación de tiamina a 129 °C en buffer fosfato de pH 4,5 a 6,5. Encontraron también una disminución de la velocidad de la reacción cuanto menor era el pH del sistema.

Fox y col. (1982) mostraron el mismo efecto del pH, entre 3,0 y 7,0, trabajando en sistemas modelo de buffer fosfato con a_w controlada por el agregado de glicerol, a temperaturas de 84 °C y 94 °C.

Bendix y col. (1951) observaron el efecto de reducción de la velocidad de pérdida de tiamina en tomates y porotos a los que se agregaba buffer citrato para bajar el pH del alimento

aproximadamente en dos unidades respecto del pH normal del producto. Los procesamientos se efectuaron a 118° y 126,5 °C.

Farrer (1955) estudió la estabilidad de la tiamina en harina del pH modificado por el agregado de diferentes cantidades de fosfato monoácido de sodio. Trabajando a 100 °C, la velocidad de pérdida de la vitamina aumenta significativamente entre pH 5,8 y 7,5.

Briozzo y col. (1987) estudiaron el efecto del ajuste de pH, en el rango 5,0-6,9, en la retención de tiamina en el procesamiento térmico de purés de arvejas, choclo, cerdo e hígado. En todos los alimentos estudiados, la ligera reducción de pH incrementa dramáticamente la retención de tiamina después del procesamiento. Por ejemplo, la retención en purés de arvejas y de choclo ajustados a pH 5,6 se incrementó en un 95% y un 63% respectivamente, comparada a la de muestras de pH normal (6,9 para la arveja y 6,5 para choclo).

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de pérdida de la tiamina ha sido estudiado, desde el punto de vista cinético, en diferentes condiciones por diversos autores. Así, trabajando con sistemas de buffer fosfato, Feliciotti y Esselen (1957) analizan la acción de este parámetro en el rango de 109 °C a 149 °C a valores de pH entre 4,5 y 7,0; Mulley y col. (1975b)

entre 121 °C y 138 °C a pH 6,0 y Fox y col. (1982) entre 84 °C y 94 °C a pH 5,0 y 7,0. En sistemas modelo de pH 5,0 y 7,0 conteniendo glicerol como humectante Fox y col. (1982) investigaron el efecto de la temperatura entre 84 °C y 94 °C. Este efecto fue también estudiado en varios purés de carnes y vegetales ($a_w \cong 0,99$) por Feliciotti y Esselen (1957) en el rango 109 °C - 149 °C; en carne vacuna picada por Skjöldebrand y col. (1983) entre 70 °C y 98 °C y por Mulley y col. (1975a) entre 121 °C y 138 °C; en leche entera por Bayoumi y Reuter (1980) entre 120 °C y 150 °C; en puré de arvejas por Mulley y col. (1975a) entre 121 °C y 138 °C y en arvejas en salmuera por Bendix y col. (1951) entre 104 °C y 138 °C. En todos los casos considerados (buffers, sistemas modelo y alimentos) es notable el efecto acelerador de la temperatura en la velocidad de degradación térmica de la tiamina. Precisamente esta sensibilidad de la reacción de deterioro con la temperatura ha permitido proponer a la tiamina como un índice químico de la eficacia del proceso de esterilización (Mulley y col., 1975c). Esto eliminaría las limitaciones inherentes de los métodos microbiológicos utilizados tradicionalmente en dicha evaluación. Con la misma finalidad, se ha propuesto recientemente al grado de destrucción de tiamina agregada durante la extrusión de alimentos como un indicador de la intensidad del proceso (Guzmán-Tello y Cheftel, 1987).

///

A pesar de la existencia de los datos cinéticos presentados respecto del efecto del pH y de la temperatura, hay pocas evaluaciones realizadas en las condiciones de procesamiento características de los A.H.A.. Por este motivo se estudia la cinética de degradación de la tiamina en sistemas modelo de pH 4,0 y 5,5 a 80°C, 90°C y 100°C.

Se eligieron como valores de pH 4,0 y 5,5 por ser el primero representativo de la mayoría de las frutas frescas y el segundo considerando que, en la tecnología de los A.H.A., muchas carnes y hortalizas (pH natural \approx 6) se ajustan a dicho valor de pH, ya que esa ligera reducción no altera apreciablemente las características organolépticas del alimento.

El rango de temperaturas de trabajo seleccionado fue el correspondiente a condiciones de procesamiento: entre 80°C y 100°C. Se ha mencionado que en la metodología de producción de los A.H.A. pueden incluirse tratamientos térmicos suaves. Una posibilidad es que los alimentos reciban una pasteurización (hasta 100°C) para matar las células vegetativas y que las esporas sobrevivientes se inhiban por el control de la a_w y el pH (Sperber, 1983). Por ejemplo, Mastrocola y col. (1987) aplicaron la ósmosis directa a alta temperatura (70°C-90°C) y tiempos cortos (1-20 minutos) para obtener cubos de zanahoria de a_w dentro del rango 0,90-0,95, con lo cual combinaban el efecto deshidra-

///

tante del tratamiento con el efecto de escaldado por la alta temperatura.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Sistemas modelo

Con el fin de evaluar en forma independiente los distintos parámetros que afectan la estabilidad de la tiamina en los alimentos se trabajó con sistemas modelo que presentaron menor complejidad que los anteriores.

Los sistemas modelo utilizados estuvieron compuestos por clorhidrato de tiamina, un buffer de fosfatos, agua, y el humectante -variable- para fijar el valor deseado de actividad de agua.

La concentración de clorhidrato de tiamina en todos los sistemas fue de aproximadamente $1\mu\text{g/ml}$.

La concentración del buffer empleado, expresado como la suma de moles agregados de KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 por litro de solución, fue de M/15. Las soluciones se ajustaron a distintos valores de pH, trabajándose ~~principalmente~~ a pH 4,0 y 5,5. Con la concentración mencionada de buffer, el pH inicial no varió durante el tratamiento térmico aplicado en los ensayos.

Los valores de a_w de las soluciones fueron de 0,950 y 0,99. Los solutos seleccionados para reducir el parámetro a_w fueron:

///

<u>no-electrolitos</u>	<u>electrolitos</u>
glicerina	NaCl
sorbitol	KCl
propilenglicol	Na ₂ SO ₄
glucosa	
sacarosa	

La cantidad de humectante requerida en los sistemas modelo de $a_w = 0,950$ se calculó mediante la ecuación de Ross (1975):

$$a_w = \prod a_i^\circ = a^\circ_{\text{tiamina}} \times a^\circ_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \times a^\circ_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} \times a^\circ_{\text{humectante}} \quad (3.1)$$

donde:

a_w = actividad de agua de la solución

a_i° = actividad de agua de cada componente calculado a la misma molalidad que en la mezcla.

Esta ecuación supone que en la solución no hay interacción entre los distintos solutos. Por lo tanto, la actividad de agua de la mezcla, a_w , es el producto de las actividades de agua de cada componente, calculada considerando que cada uno de ellos está disuelto en todo el agua del sistema.

Los valores de a_i° para KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 fueron obtenidos

///

a partir de los datos experimentales reportados por Ferro Fontán y col. (1979). Dichos valores resultaron:

$$\text{pH } 5,5: \quad a^{\circ}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \times a^{\circ}_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 0,9979$$

$$\text{pH } 4,0: \quad a^{\circ}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 0,9978$$

El valor $a^{\circ}_{\text{tiamina}}$ se consideró igual a uno, debido a su baja concentración de los sistemas modelo.

Con los valores de $a^{\circ}_{\text{humectante}}$ despejados a partir de la ecuación 3.1 se determinaron las cantidades necesarias de cada soluto (en g/100g de solución binaria) para alcanzar la a_w deseada.

Los valores de concentración de electrolitos para llegar a la $a^{\circ}_{\text{humectante}}$ deseada fueron calculadas de acuerdo a la expresión de Pitzer y Mayorga (1973). Estos autores desarrollaron un sistema de ecuaciones para las propiedades termodinámicas de los electrolitos en base a un análisis del modelo de Debye-Hückel. En dichas ecuaciones el coeficiente osmótico (ϕ) está expresado como (Pitzer y Mayorga, 1973):

$$\phi - 1 = \sum_M \sum_X f + m \frac{2 V_M V_X}{V} B_{MX} + m^2 \frac{(V_M V_X)^{3/2}}{V} C_{MX} \quad (3.2)$$

donde V_M y V_X son el número de iones M y X de la fórmula del

///

electrolito y Z_M y Z_X son sus respectivas cargas en unidades electrónicas; además $V = V_M + V_X$. Los otros parámetros son:

$$f = - A \frac{I^{1/2}}{1 + b I^{1/2}} \quad (3.3)$$

$$B_{MX} = \beta_{MX}^{(0)} + \beta_{MX}^{(1)} \exp(-\alpha I^{1/2}) \quad (3.4)$$

$\beta_{MX}^{(0)}$ y $\beta_{MX}^{(1)}$ definen el primer y segundo coeficiente virial, C_{MX} define el tercer coeficiente virial e I es la fuerza iónica dada por $1/2 \sum_i^n m_i Z_i^2$, donde m_i es la molalidad de la especie i . A es el coeficiente de Debye-Hückel para la función ϕ y tiene un valor de 0,392 a 25°C. La constante b está tomada igual a 1,2 para todos los solutos y $\alpha = 2$ (Pitzer y Mayorga, 1973). Los mejores valores de $\beta^{(0)}$, $\beta^{(1)}$ y C para NaCl, KCl y Na₂SO₄ fueron evaluados por Pitzer y Mayorga (1973):

	$\beta^{(0)}$	$\beta^{(1)}$	C
NaCl	0,0765	0,2664	0,00127
KCl	0,04835	0,2122	-0,00084
Na ₂ SO ₄	0,0261	1,484	0,00938

///

Con los valores de los coeficientes osmóticos molares (ϕ) hallados tal como se ha referido, la $a^\circ_{\text{humectante}}$ para las soluciones de electrolitos se calculó de la ecuación:

$$\ln a^\circ_{\text{humectante}} = \frac{-v m \phi}{55,51} \quad (3.5)$$

donde v es el número de iones generados por la molécula y m es la concentración molal.

Para los no electrolitos, el cálculo de la $a^\circ_{\text{humectante}}$ se realizó a través de la ecuación de Norrish (1966):

$$a^\circ_{\text{humectante}} = x_1 \exp (-K x_2^2) \quad (3.6)$$

donde:

x_1 = fracción molar de agua

x_2 = fracción molar de soluto

K = constante de Norrish

Los valores de K utilizados fueron (Chirife y col., 1980):

///

- propilenglicol	K = 1,00
- glicerol	K = 1,16
- sorbitol	K = 1,65
- glucosa	K = 2,25
- sacarosa	K = 6,47

En todos los casos la concentración de soluto calculado a partir de las ecuaciones 3.5 y 3.6 estuvo expresado en % (p/p). El pasaje a g soluto/100ml de solución se hizo mediante los datos de densidad de las respectivas soluciones reportadas en el Handbook of Chemistry and Physics (1977), despreciándose en dichos valores de densidad la contribución del buffer y la tiamina, presentes en el sistema en concentraciones mucho menores.

La concentración de fosfatos en los sistemas de pH 5,5 fue la que corresponde al buffer de Sörensen (M/15). Para los sistemas de pH 4,0 se utilizó KH_2PO_4 (M/15). Luego de agregar el humectante, los sistemas se ajustaron con agregado de HCl ($\approx 4\text{N}$) o NaOH ($\approx 4\text{N}$) al pH correspondiente.

Con las cantidades así calculadas se prepararon los distintos sistemas modelo de a_w reducida (0,950), verificándose luego en forma experimental que la a_w predicha coincidiera con la a_w real.

Los sistemas modelo de $a_w \approx 0,99$ se prepararon de la misma forma que los anteriores pero sin el agregado de humectante.

La composición de los sistemas modelo se detalla en la tabla 3.1.

3.2. Reactivos utilizados

En la formulación de los distintos sistemas se utilizaron las siguientes drogas de calidad analítica:

KH_2PO_4	Mallinckrodt Chem. Works. St. Louis, USA
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Mallinckrodt Chem. Works. St. Louis, USA
Clorhidrato de tiamina....	Sigma Chem. Co. St. Louis, USA
Glicerol.....	Merck. Darmstadt, Alemania Occidental
Sacarosa.....	Mallinckrodt Chem. Works. St. Louis, USA
Glucosa.....	Mallinckrodt Chem. Works. St. Louis, USA
Sorbitol.....	Mallinckrodt Chem. Works. St. Louis, USA
Propilenglicol.....	Mallinckrodt Chem. Works. St. Louis, USA
NaCl	Merck. Darmstadt, Alemania Occidental
KCl	Merck. Darmstadt, Alemania Occidental
Na_2SO_4	Mallinckrodt Chem. Works. St. Louis, USA

///

Tabla 3.1 Composición de los sistemas modelo de $a_w = 0,950$

. Sistemas modelo de pH 5,5. Composición del buffer.

KH_2PO_40,8719 g/100ml

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$0,0463 g/100ml

. Sistemas modelo de pH 4,0. Composición del buffer.

KH_2PO_40,9073 g/100ml

(ajustado con HCl)

. Concentración de humectante

Soluto	pH	Concentración g/100g solución	Concentración g/100ml solución
KCl	5,5	10,12	10,7687
	4,0	10,10	10,7474
NaCl	5,5	7,71	8,1262
	4,0	7,70	8,1153
Na_2SO_4	5,5	17,16	19,8833
	4,0	17,15	19,8717

Continuación Tabla 3.1

Soluto	pH	Concentración g/100g solución	Concentración g/100ml solución
Sorbitol	5,5	32,20	35,9642
	4,0	32,16	35,9195
Glicerol	5,5	19,67	23,6344
	4,0	19,64	23,5954
Glucosa	5,5	31,47	36,0741
	4,0	31,43	36,0125
Sacarosa	5,5	43,37	51,7794
	4,0	43,33	51,7230
Propilenglicol	5,5	16,92	17,2863
	4,0	16,90	17,2655

3.3. Preparación de las soluciones

Para la preparación de los sistemas modelo se disolvieron las sales del buffer y el humectante en agua destilada. Previo a completar el volumen final de la solución se controló el pH con un equipo marca Metrohm modelo E. 632, calibrado con buffers, ajustándose a los valores deseados con HCl ($\approx 4N$) o NaOH ($\approx 4N$). Luego se agregó la cantidad requerida de una solución concentrada de tiamina ($250 \mu\text{g/ml}$) preparada en el momento para lograr una concentración final de clorhidrato de tiamina en todos los sistemas modelo de $\approx 1 \mu\text{g/ml}$. Finalmente se llevó a volumen, verificándose nuevamente el pH.

Las soluciones se envasaron en tubos de vidrio con tapa a rosca de 9 ml. de volumen total, dosificándose 4 ml. en cada uno.

3.4. Medición de la actividad de agua

Para la determinación del valor de actividad de agua de las muestras se utilizó un equipo Novasina Thermoconstanter Humidat TH2 (Novasina AG, C - 8050 Zurich, Suiza). El mismo consiste en una cámara de medición con temperatura controlada y un sensor de humedad relativa y temperatura modelo BS-3. El sensor

///

de humedad está basado en los cambios de conductividad de un electrolito higroscópico.

Las determinaciones de a_w se realizaron a una temperatura constante de 25°C. Las muestras se mantuvieron a 25°C durante dos horas antes de la medición para lograr un rápido equilibrio térmico. El procedimiento para calibrar el equipo Novasina fue el descrito por Kitic y col. (1986). Para cada serie de mediciones se obtuvo una curva de calibración con soluciones salinas saturadas de a_w conocida en el rango de a_w de las muestras a medir. Los valores de a_w a 25°C de dichas soluciones tomadas como referencia, son los indicados a continuación (Resnik y col., 1984):

- KCl	$a_w = 0,843$
- BaCl ₂	$a_w = 0,902$
- KNO ₃	$a_w = 0,925$
- K ₂ SO ₄	$a_w = 0,972$

3.5. Tratamiento térmico

Para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico en la estabilidad de la tiamina, los sistemas modelo se calentaron durante distintos tiempos a 100°C,

///

90 °C y 80 °C en un baño termostático de glicerina (con la temperatura controlada en $\pm 0,1$ °C), con agitación permanente de los tubos.

Para tratamientos térmicos a menor temperatura (55 °C) se utilizó una estufa de circulación forzada (Lab Line Imperial III, Lab-Line Instruments Inc., Melrose Park, Ill., USA).

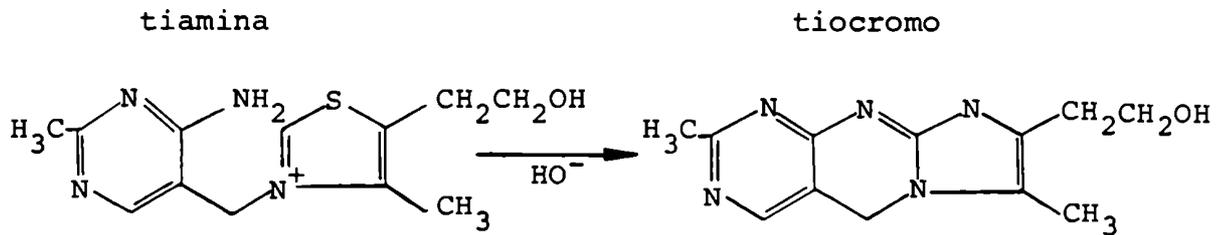
Antes del tratamiento térmico y después del mismo, hasta el momento de medición de vitamina B₁, las muestras se mantuvieron en una congeladora a -30 °C. Ensayos realizados para analizar una posible degradación de la vitamina en el estado congelado durante períodos prolongados mostraron que no había pérdida detectable de la misma en dichas condiciones.

3.6. Determinación de tiamina por el método fluorométrico

Existen numerosos procedimientos para el análisis de la tiamina (Strobecker y Henning, 1965). Uno de los más usados para los alimentos es el método químico fluorométrico. El mismo involucra la oxidación de la tiamina en forma cuantitativa a tio-cromo en medio alcalino. Esta reacción da un producto fluorescente, que es proporcional a la tiamina presente en la muestra.

La reacción que tiene lugar es:

///



Si se analiza un sistema libre de sustancias interferentes, la determinación consta de los siguientes pasos:

a- Oxidación

Se agrega a la muestra el agente oxidante, usándose en este caso HgCl_2 (Edwin, 1979 y Ryan e Ingle, 1980). A continuación se agrega NaOH para llevar el medio al pH óptimo de la reacción permitiendo que la fluorescencia sea máxima.

b- Extracción

Después de un lapso adecuado para que se complete la reacción de oxidación, el tiocromo formado se extrae con isobutanol para separarlo de otras sustancias fluorescentes y del agente oxidante, que puede también modificar la medición.

c- Medición de fluorescencia

Se toman alícuotas de la fase alcohólica, midiéndose su fluorescencia. Se realizan mediciones de blancos y patrones de tiamina para finalmente hallar la concentración de vitamina en la muestra.

3.6.1. Reactivos utilizados

- HgCl₂ (Merck-Darmstadt, Alemania Occidental).....5 x 10⁻³ M
- Na(OH) (Mallinckrodt, Chem. Works, St. Louis, USA).....30% p/v
- Isobutanol (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina).

3.6.2. Fluorómetro

Para la medición de la tiamina se utilizó un espectrofotofluorómetro marca Aminco-Bowman, con una lámpara de xenón como fuente de excitación, la cual tiene una salida espectral comprendida entre 150 nm y 1500 nm operando en el rango visible y ultravioleta. Cuenta con monocromadores de excitación y emisión independientes, un tubo fotomultiplicador. (detector) apropiado y una cámara de temperatura constante. Puede detectar desde microgramos a nanogramos del compuesto orgánico, dependiendo de la intensidad de fluorescencia del mismo.

El equipo tiene una respuesta lineal dentro del rango

///

de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de tiamina. Las mediciones se realizaron con celdas de cuarzo de 1cm. y 0,1cm. de paso de luz.

Para evitar ruidos en el equipo y obtener una adecuada resolución y sensibilidad, se utilizó el siguiente arreglo de slits en el espectrofotofluorómetro:

SLIT 1 (Monocromador)	= 3
SLIT 2 (Celda)	= 2
SLIT 3 (Celda)	= 3
SLIT 4 (Celda)	= 3
SLIT 5 (Celda)	= 2
SLIT 6 (Monocromador)	= 1
SLIT 7 (Fotomultiplicador)	= 2

3.6.3. Técnica de medición

Se pipetearon 0,4 ml de la muestra, se agregaron 0,15 ml de HgCl_2 y 0,8 ml. de NaOH. La mezcla se agitó durante 30 segundos, se dejó reaccionar 10 minutos y luego se agregaron 2 ml. de isobutanol. Se extrajo mediante agitación (Vortex) durante 2 minutos. Se centrifugó a 2.500 rpm durante 5 minutos. Se midió la fluorescencia del tiocromo extraído en la fase orgánica, ajustando los monocromadores de excitación y emisión a 361 nm y 426 nm respectivamente. Todas las mediciones se hicieron por duplicado, siendo en este caso el error involucrado menor del 3%.

///

Pruebas realizadas con los sistemas modelo sin agregado de tiamina mostraron luego del tratamiento térmico valores de fluorescencia despreciables. Se consideró como blanco de medición al isobutanol, que puede presentar fluorescencia por sus impurezas. En todas las mediciones realizadas los valores de lectura para el isobutanol fueron como máximo un orden menor que el menor valor leído para las muestras.

3.6.4. Curva de calibración

Se verificó el funcionamiento del equipo midiendo soluciones de sulfato de quinina en ácido sulfúrico 0,1N. Se obtuvo la respuesta del espectrofotofluorómetro en el rango de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$. de concentración, comprobándose su linealidad (Mosteller, 1946). Las longitudes de onda seleccionadas para esta medición fueron 338 nm. y 449 nm. para el monocromador de excitación y emisión respectivamente.

Para realizar la curva de calibración se prepararon soluciones de distintas concentraciones entre 0 y 1,5 $\mu\text{g/ml}$. a partir de la solución patrón de clorhidrato de tiamina. Se observó una correlación lineal entre las lecturas de fluorescencia y las concentraciones de tiamina presente en el rango estudiado.

Previo a la medición de las muestras correspondientes

///

a una corrida se determinó la curva de calibración con soluciones frescas preparadas a partir de la solución patrón.

Los datos de concentración de tiamina calculados a partir de los valores de fluorescencia se expresaron como:

$$\% \text{Tiamina remanente (TR\%)} = \frac{[\text{tiamina}]_t}{[\text{tiamina}]_{t_0}} \times 100 \quad (3.7)$$

t = tiempo

t₀ = tiempo inicial

La medición por el método fluorométrico se utilizó para todos los sistemas modelo estudiados, con excepción de aquellos que contenían glucosa o sacarosa como humectantes, pues se comprobó que tanto los azúcares como sus productos de degradación constituyen una interferencia a este método químico de determinación de la tiamina, teniéndose como resultado valores menores de concentración de la vitamina que los reales. Se verificó que si se usaban mayores concentraciones de HgCl₂ para evitar este inconveniente, las mismas estaban asociadas con la formación de precipitados que pueden ocluir tiocromo. Por lo tanto, los sistemas con glucosa o sacarosa fueron analizados empleando el método microbiológico explicado en el punto siguiente.

///

3.7. Determinación de tiamina por el método microbiológico

Los métodos microbiológicos para la cuantificación de vitaminas se basan en el hecho de que un microorganismo puede reproducirse sólo en la presencia de una vitamina específica. Cuando una alícuota de la muestra, que contiene la vitamina a ser determinada, se agrega al medio de ensayo seguida por la inoculación del organismo de prueba, el crecimiento del mismo es proporcional al contenido de vitamina (Voigt y col., 1978). Dentro de un cierto rango de concentración, la respuesta medida será directamente proporcional a la cantidad de vitamina presente, y, dentro de este rango, la muestra y las soluciones de referencia pueden compararse con exactitud. Como grupo, los lactobacilos son los empleados más ampliamente como organismos de prueba. A pesar de que las levaduras, los hongos y los protozoarios también se usan, sus características de crecimiento son menos adecuadas.

Un ensayo cuantitativo de vitamina a través de este tipo de método depende de la relación entre el dosaje de vitamina y la respuesta del organismo a prueba. A medida que la dosis se aumenta desde la que no da efecto hasta aquella que da un efecto máximo, la respuesta aumenta continuamente en una curva sigmoidea dosaje-respuesta.

Sarett y Cheldelin (1944) introdujeron el método de

///

cuantificación de tiamina en el que como microorganismo de ensayo se utiliza el Lactobacillus fermenti 36 (ATCC 9338). Este microorganismo posee una alta sensibilidad a la vitamina, cercana a 1 ng (Strobecker y Henning, 1965) y, en condiciones de cultivo controladas, es específico para la molécula intacta de tiamina.

Como se mencionó en el punto anterior, frente a la interferencia que representan los azúcares y sus productos de degradación para el análisis de tiamina por el método fluorométrico, para usarlo hubiera sido necesario adoptar complejos procedimientos de purificación tendientes a eliminar dichas interferencias. Estas etapas no harían sino incorporar nuevas fuentes de error y además el método perdería las características de practicidad y exactitud necesarias.

Por tales motivos, y con el objeto de poder analizar a través de un método apropiado los sistemas modelo conteniendo glucosa y sacarosa como solutos, en esta parte del trabajo se aplicó el método de Sarett y Cheldelin (1944) de acuerdo con las modificaciones introducidas por Carrera (1974). Las mismas se refieren a los volúmenes empleados en la determinación, tanto de muestra como de solución standard. En ambos casos se utilizan volúmenes máximos de 0,20 ml en lugar de 5,0 ml usados en el método original, con lo cual se simplifica la metodología

///

a la vez que se descartan otras fuentes de error.

A continuación se describe el método de análisis:

a- Medio Basal: Se utiliza el Bacto-Thiamine Assay Medium (DIFCO), tanto para mantener el microorganismo como para hacer la determinación de tiamina.

b- Solución standard: Se prepara en el momento de la determinación una solución de 200µg/ml de clorhidrato de tiamina, la cual se diluye hasta una concentración de 240ng/ml.

c- Inóculo: Se prepara a partir de un cultivo stock de Lactobacillus fermenti ATCC 9338, realizando la siembra 20-24 horas antes de la determinación en Bacto-Micro Inoculum Broth (DIFCO). Una vez transcurrido ese tiempo se procede al lavado de la cepa, utilizando para ello 5-6 porciones de 10ml de solución fisiológica estéril, preparándose finalmente, a través de una resuspensión, el inóculo que va a ser empleado en la determinación.

d- Procedimiento analítico: Se prepara la curva de referencia trabajando en un rango de concentración comprendido entre 0,0 y 48,0 ng de clorhidrato de tiamina.

Para ello se dispone de una serie de tubos de ensayo, en los cuales, por triplicado, se adicionan los siguientes volúmenes crecientes de solución standard de trabajo: 0,03ml, 0,06ml, 0,10ml, 0,12ml, 0,15ml y 0,20ml.

///

Paralelamente, y también por triplicado, se ensaya la muestra incorporando en la correspondiente serie de tubos de ensayo los siguientes volúmenes: 0,06ml, 0,10ml, 0,12ml y 0,15ml.

El conjunto se completa con dos puntos de concentración cero y de los cuales uno sin sembrar constituye el blanco no inoculado, mientras que el restante, sembrado, representa el testigo o blanco inoculado.

Los tubos así preparados son cubiertos con tapas, luego de haberseles adicionado 10ml del medio de cultivo (punto a). La totalidad del material se esteriliza 15 minutos en vapor, enfriando luego rápidamente. Una vez fríos los tubos se siembran asépticamente, a excepción del blanco no inoculado, con una gota del inóculo (punto c). Se incuba luego el conjunto de tubos durante 16-18 horas a 37°C, manteniendo constante la temperatura entre $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Posteriormente se realiza la evaluación turbidimétrica en un espectrofotómetro Spectronic Bausch y Lomb a 580 nanómetros.

e- Método de cálculo: Se aplica el método estadístico según se halla descrito en A.O.A.C. (1980). Para cada nivel de solución de ensayo utilizado se calcula un contenido de vitamina/ml de solución de ensayo. Se calcula el promedio de los valores obtenidos de los tubos que no varían en más de $\pm 10\%$ de este promedio. Si el número de valores aceptables obtenidos es menor que 2/3 del

///

número original de tubos usados en los 4 niveles de solución de ensayo, los datos son insuficientes para calcular la potencia de la muestra. Si el número de valores aceptables remanentes es mayor o igual que los 2/3 del número original de tubos, se calcula el contenido de vitamina de la muestra del promedio de los mismos.

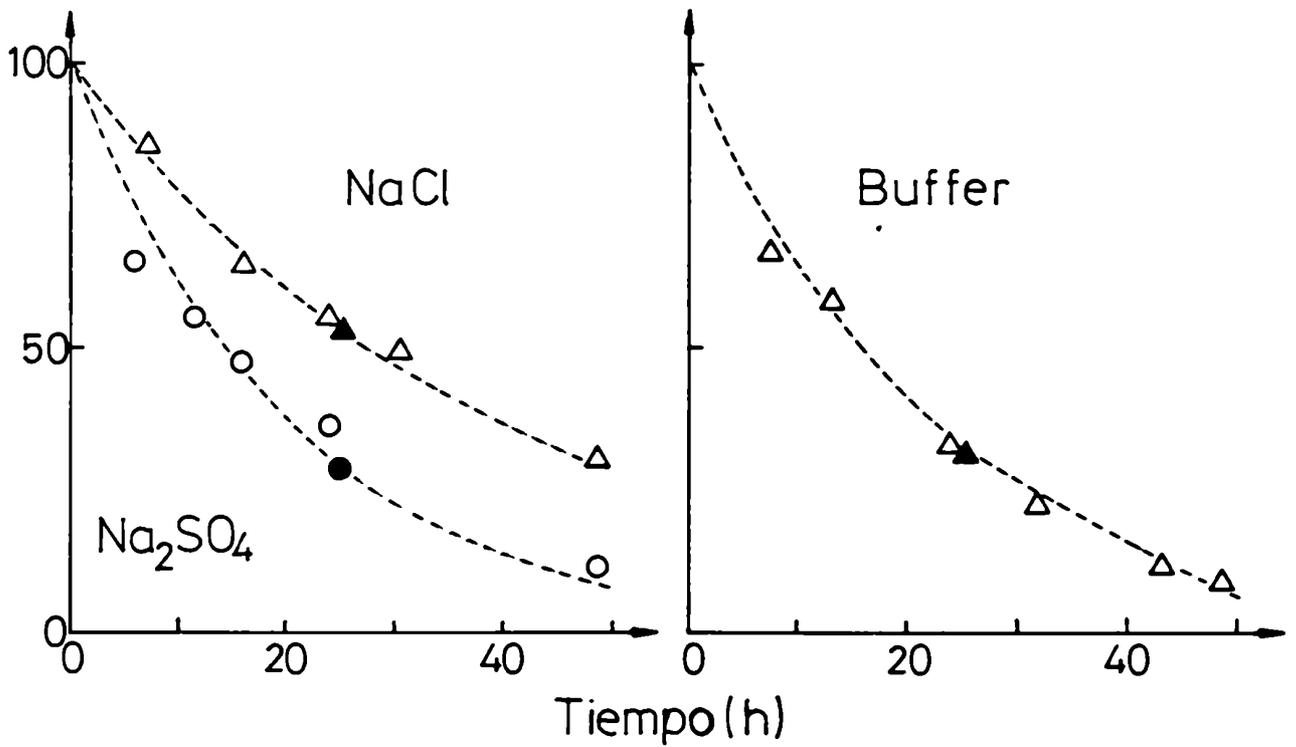
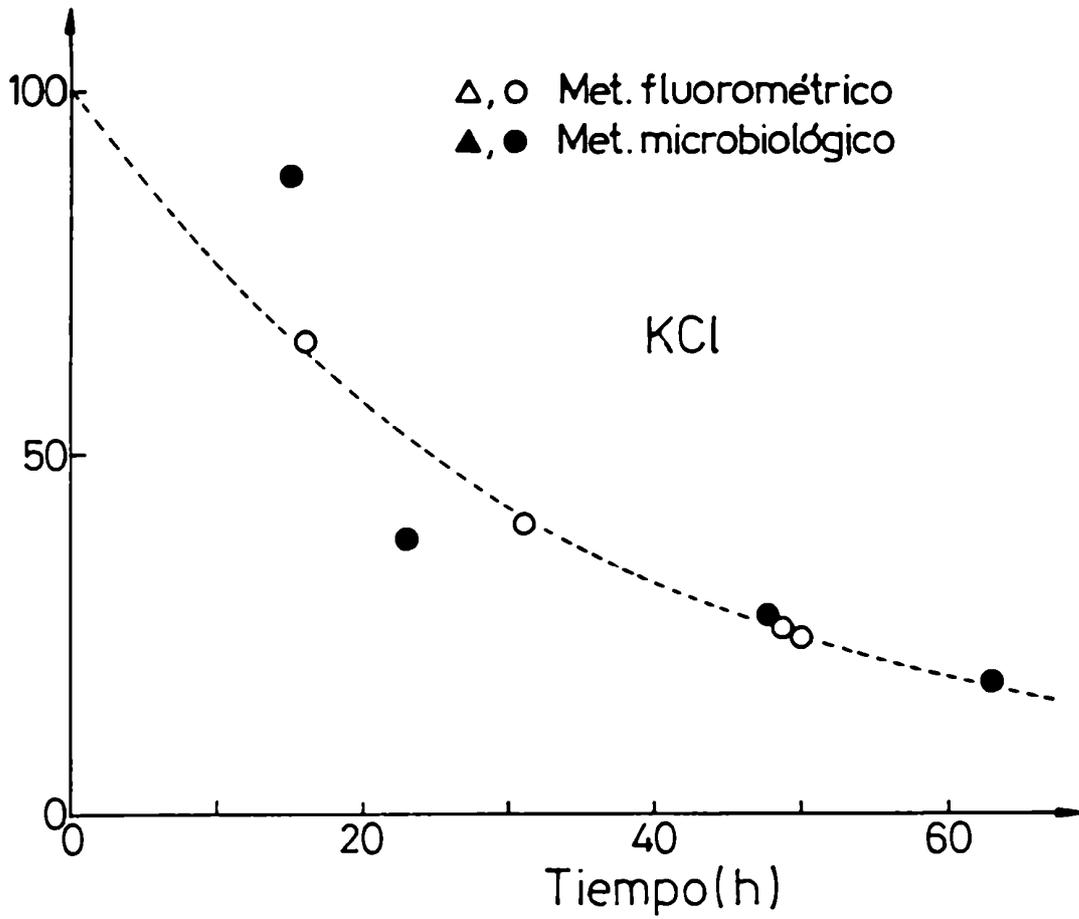
Como una forma de verificar la equivalencia entre los resultados obtenidos por el método microbiológico y el método fluorométrico se hicieron algunas determinaciones de retención de tiamina por ambos métodos en sistemas conteniendo diversos humectantes (no azúcares). Esos resultados se ven en la figura I; se aprecia que la concordancia es razonablemente buena, especialmente si tenemos en cuenta que ambos métodos analíticos se basan en principios enteramente diferentes.

///

Figura I

Retención de tiamina en sistemas modelo de $a_w = 0,950$ y

en el sistema de $a_w \approx 1$ (buffer), a pH 4,0 y 100°C



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Cinética de la reacción de degradación térmica de tiamina

4.1.1. Constante de la velocidad de reacción

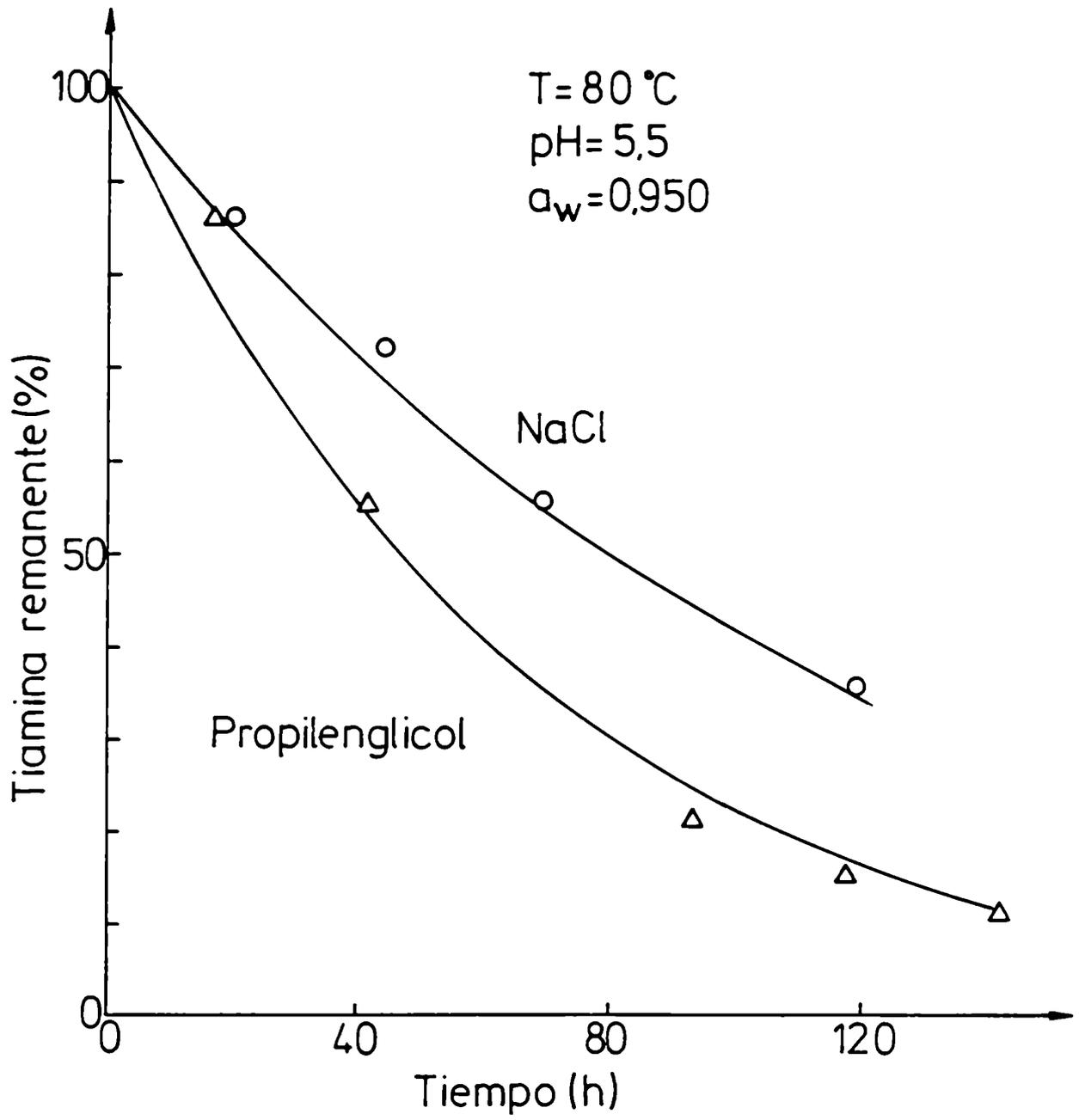
Se analizó la retención de tiamina en función del tiempo de tratamiento térmico a 80°C, 90°C y 100°C en los sistemas modelo de a_w 0,950 (ajustada con KCl, NaCl, Na₂SO₄, glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa) así como en sistemas modelo de $a_w \approx 1$, a valores de pH 4,0 y 5,5. En la figura 1 se representa la variación de la concentración de la vitamina con el tiempo de calentamiento en dos de los sistemas modelo utilizados, conteniendo NaCl o propilenglicol como humectantes, a pH 5,5 y a 80°C. Puede observarse que las curvas son similares y están influenciadas por la presencia del humectante. Un efecto similar se encontró para los demás sistemas y condiciones de trabajo estudiados.

Teniendo en cuenta el objeto de realizar el análisis cinético de los datos experimentales, es conveniente recordar el concepto de "velocidad de reacción".

Si se considera un sistema homogéneo de composición uniforme, cerrado, isotérmico a presión constante, en el cual está

Figura 1

Efecto del tiempo de calentamiento a 80°C en la
retención de tiamina



ocurriendo una reacción química simple, se puede definir la velocidad de esa reacción química (r) como:

$$r = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} \quad (4.1)$$

donde

V = volumen del sistema

ξ = extensión de la reacción = $\frac{n_i - n_{i0}}{\nu_i}$

t = tiempo

n_i = número de moles de la especie i

n_{i0} = número de moles iniciales de la especie i

ν_i = coeficiente estequiométrico de la especie i

Diferenciando la expresión para ξ y reemplazando en 4.1 resulta:

$$r = \frac{1}{\nu_i} \frac{1}{V} \frac{dn_i}{dt} \quad (4.2)$$

Si se define la velocidad de reacción para la especie i como:

$$r_i \equiv \frac{1}{V} \frac{dn_i}{dt} \quad (4.3)$$

///

entonces:

$$r_i = v_i r \quad (4.4)$$

En términos de concentraciones molares, $c_i = n_i/V$, la ecuación 4.4 queda:

$$r_i = \frac{dc_i}{dt} \quad (4.5)$$

y esta expresión es la que se utilizará en el tratamiento siguiente.

Los datos cinéticos experimentales se analizaron aplicando el método integral. En todos los casos se halló que el mejor ajuste de los mismos se lograba considerando una cinética de primer orden para la velocidad de reacción. Luego la ecuación 4.5 se puede expresar como:

$$- \frac{dc}{dt} = kc \quad (4.6)$$

donde k es la constante de velocidad de la reacción (h^{-1}) y c la concentración de tiamina ($\mu\text{g/ml}$) al tiempo t .

///

Integrando esta expresión resulta:

$$\ln \frac{c}{c_0} = -kt \quad (4.7)$$

siendo c_0 la concentración inicial de tiamina.

En la figura 2 se representa el primer término de la ecuación 4.7 en función del tiempo para sistemas modelo de pH 4,0 con NaCl o KCl como humectantes a las tres temperaturas de trabajo. Puede observarse en la misma el cumplimiento del comportamiento de primer orden. Asimismo puede notarse que a medida que se incrementa la temperatura, la velocidad de reacción aumenta. Para iguales condiciones de trabajo, la retención de tiamina en el sistema modelo con NaCl como soluto es similar a la obtenida en el sistema modelo ajustado con KCl.

La figura 3 muestra los datos experimentales para los mismos sistemas pero a pH 5,5.

Puede verse que las retenciones son menores que las correspondientes para iguales sistemas a pH 4,0 (figura 2).

Las figuras 4 y 5 representan las variaciones de concentración de la vitamina en el sistema modelo con Na_2SO_4 como humectante y en el sistema modelo de $a_w \cong 1$ (buffer), a valores de pH 4,0 y 5,5 respectivamente. Las figuras 6 y 7 lo hacen para

///

Figura 2

Retención de tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950
ajustada con NaCl o KCl, y pH 4,0

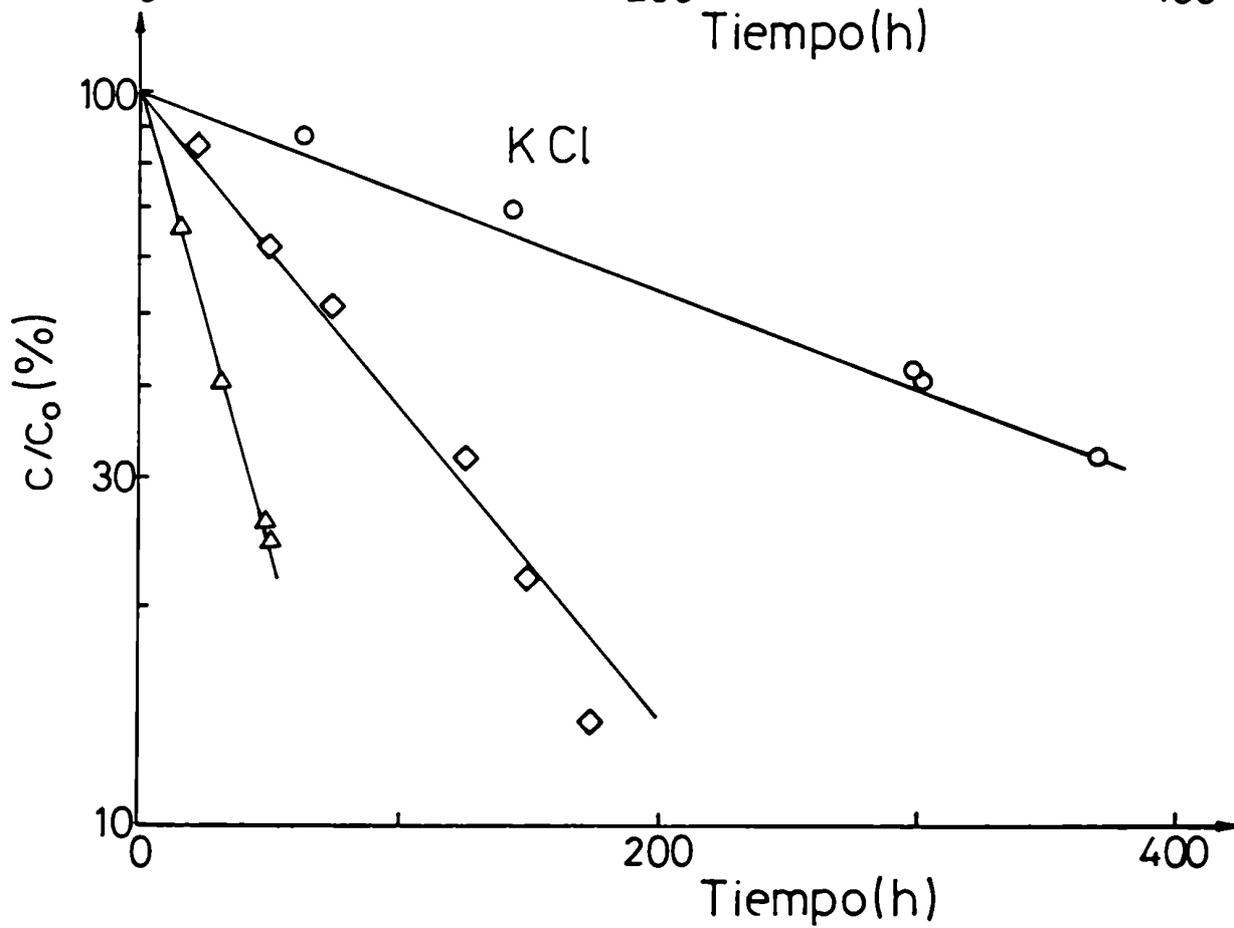
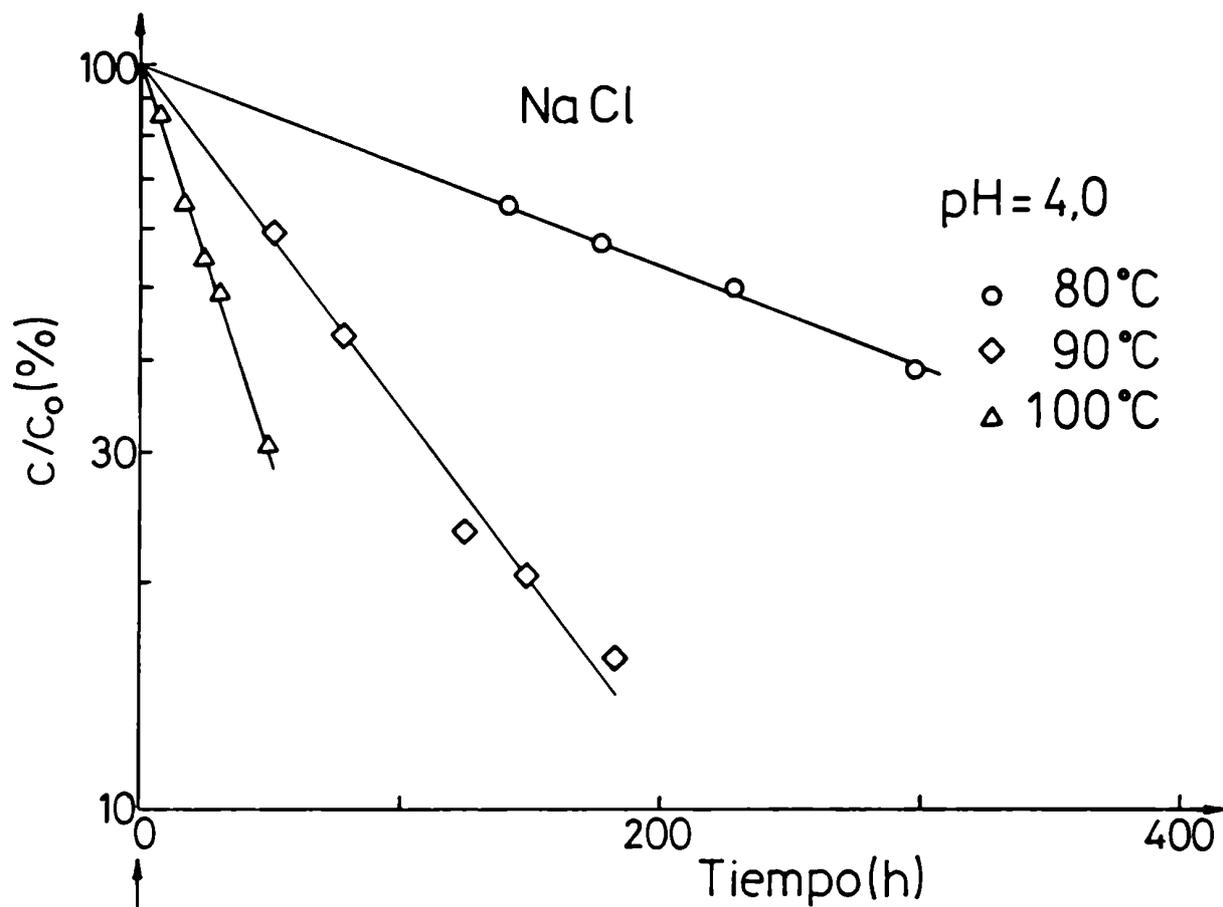


Figura 3

Retención de tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950

ajustada con NaCl o KCl, y pH 5,5

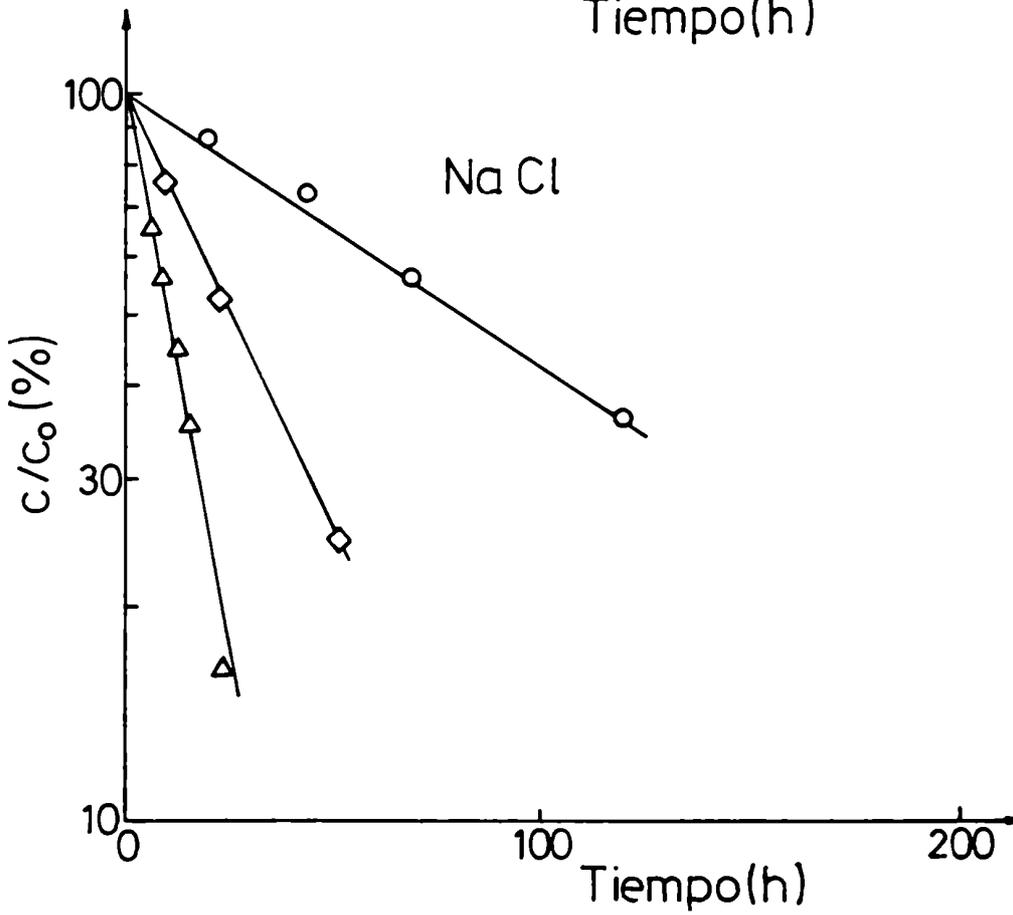
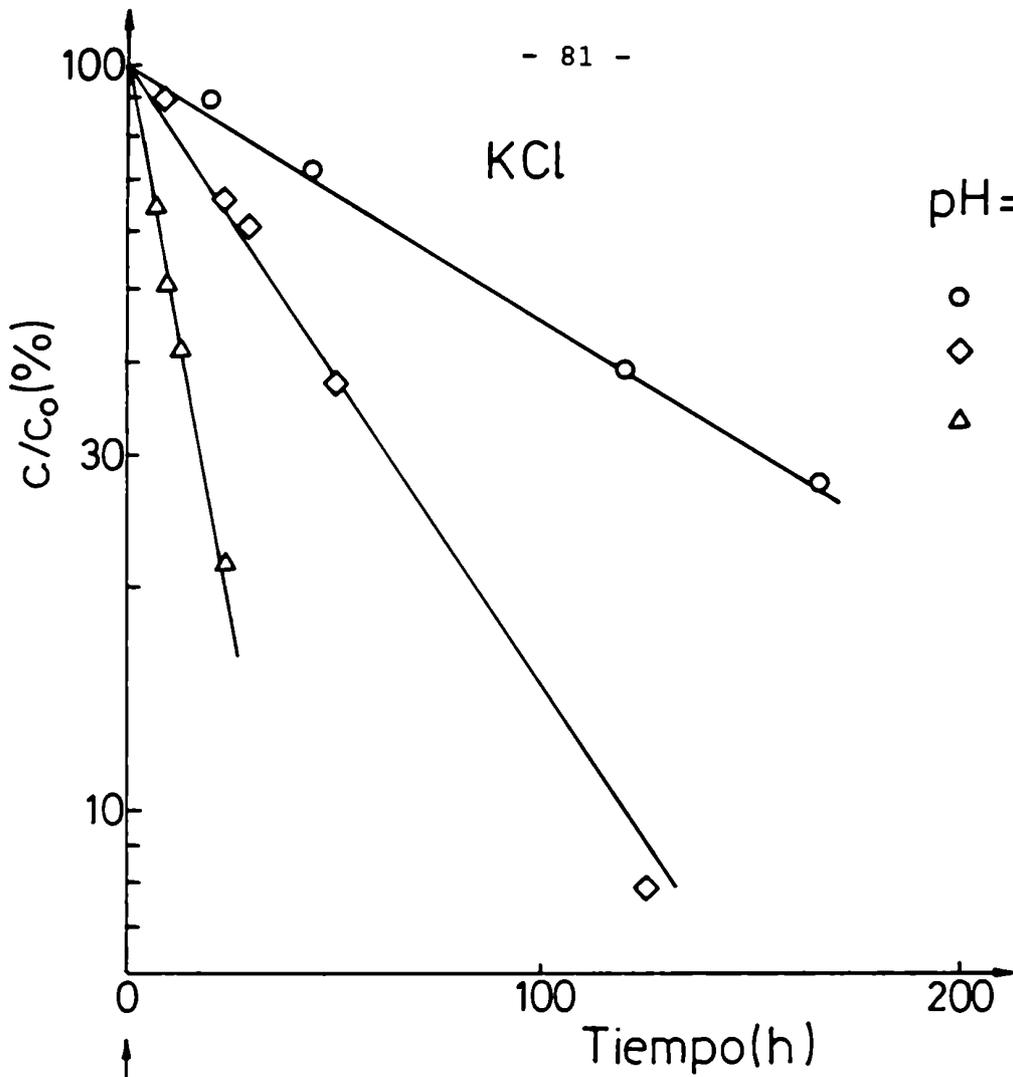


Figura 4

Retención de tiamina en el sistema modelo de a_w 0,950
ajustada con Na_2SO_4 y en el sistema modelo
de $a_w \approx 1$ (buffer), a pH 4,0

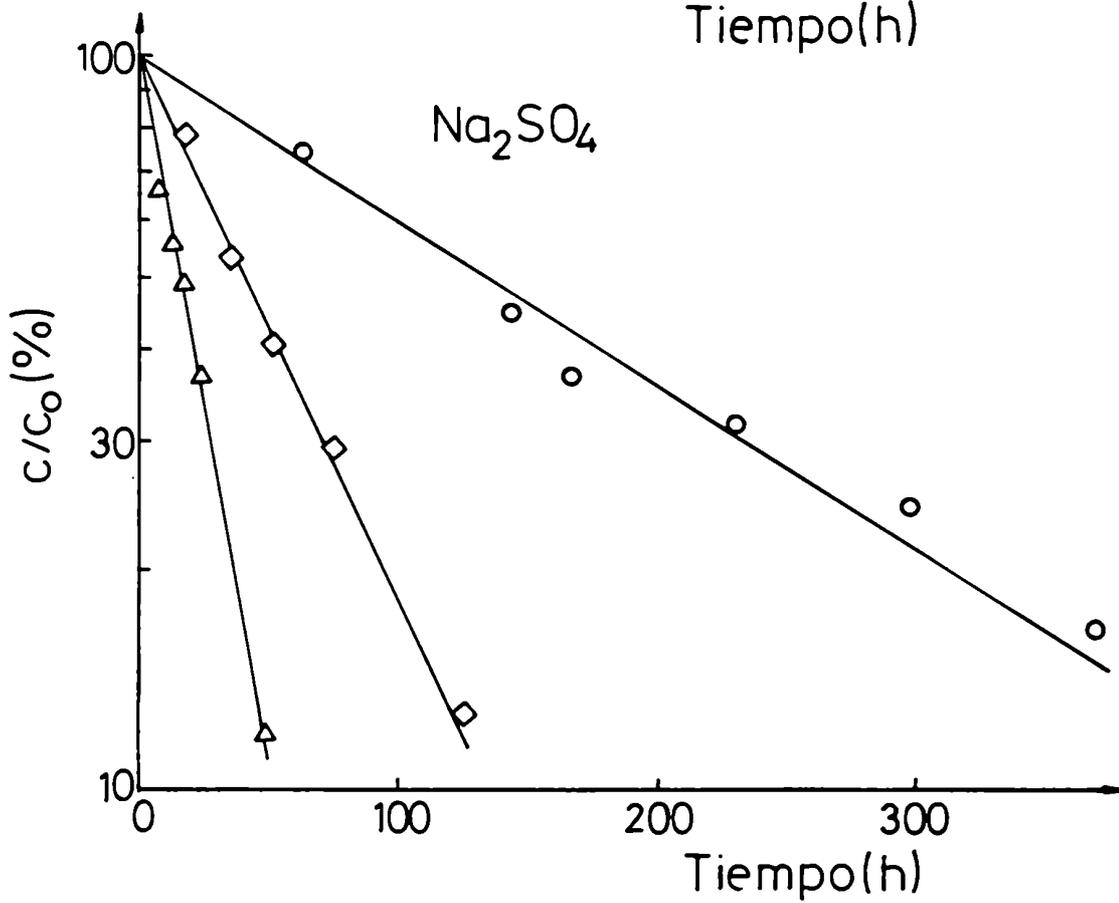
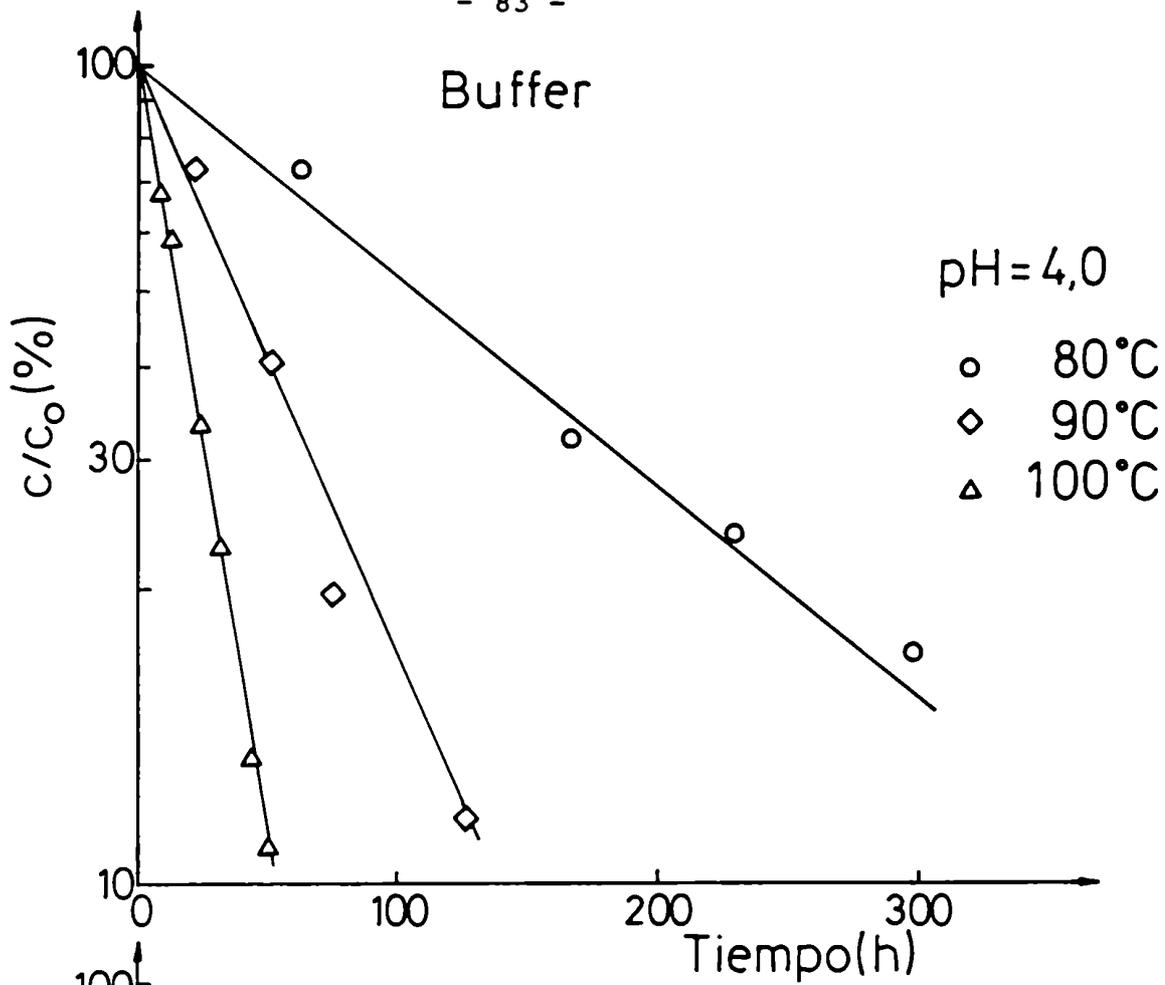


Figura 5

Retención de tiamina en el sistema modelo de a_w 0,950
ajustada con Na_2SO_4 y en el sistema modelo
de $a_w \approx 1$ (buffer), a pH 5,5

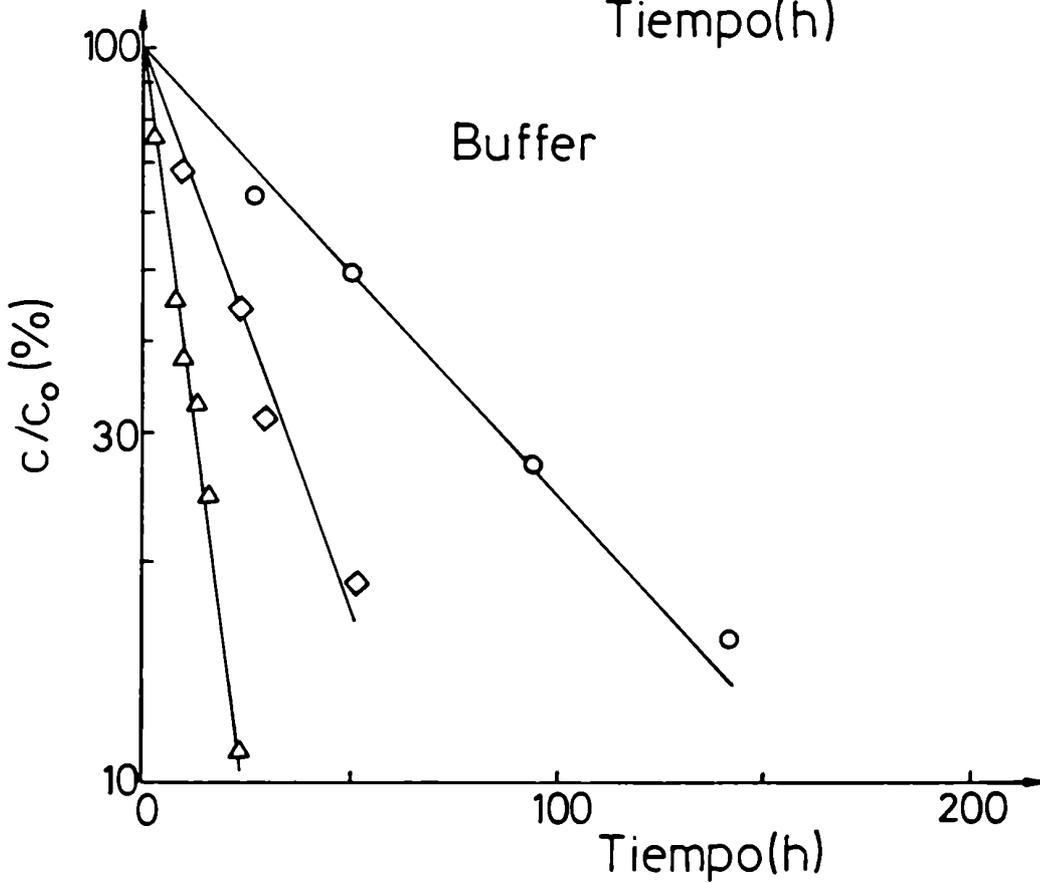
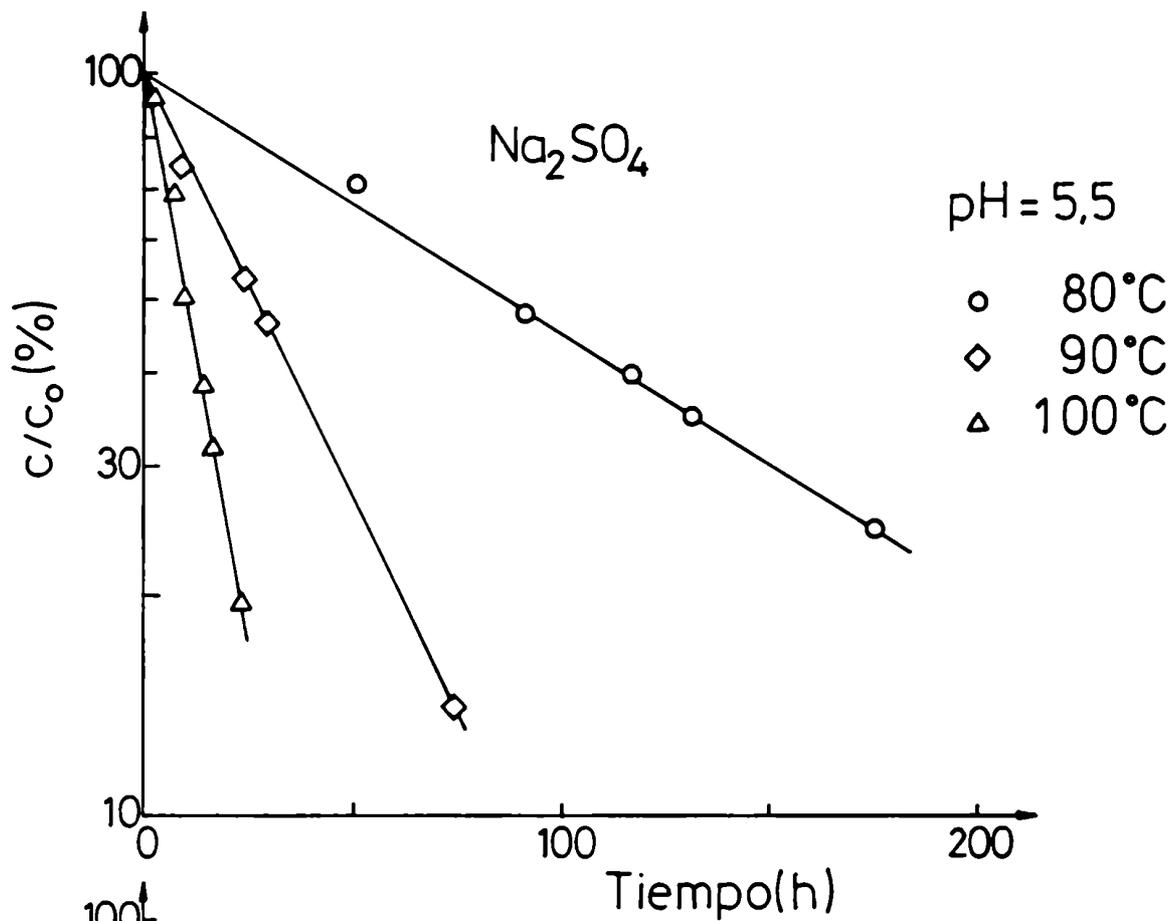


Figura 6

Retención de tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950

ajustada con glicerol, propilenglicol

o sorbitol, y pH 4,0

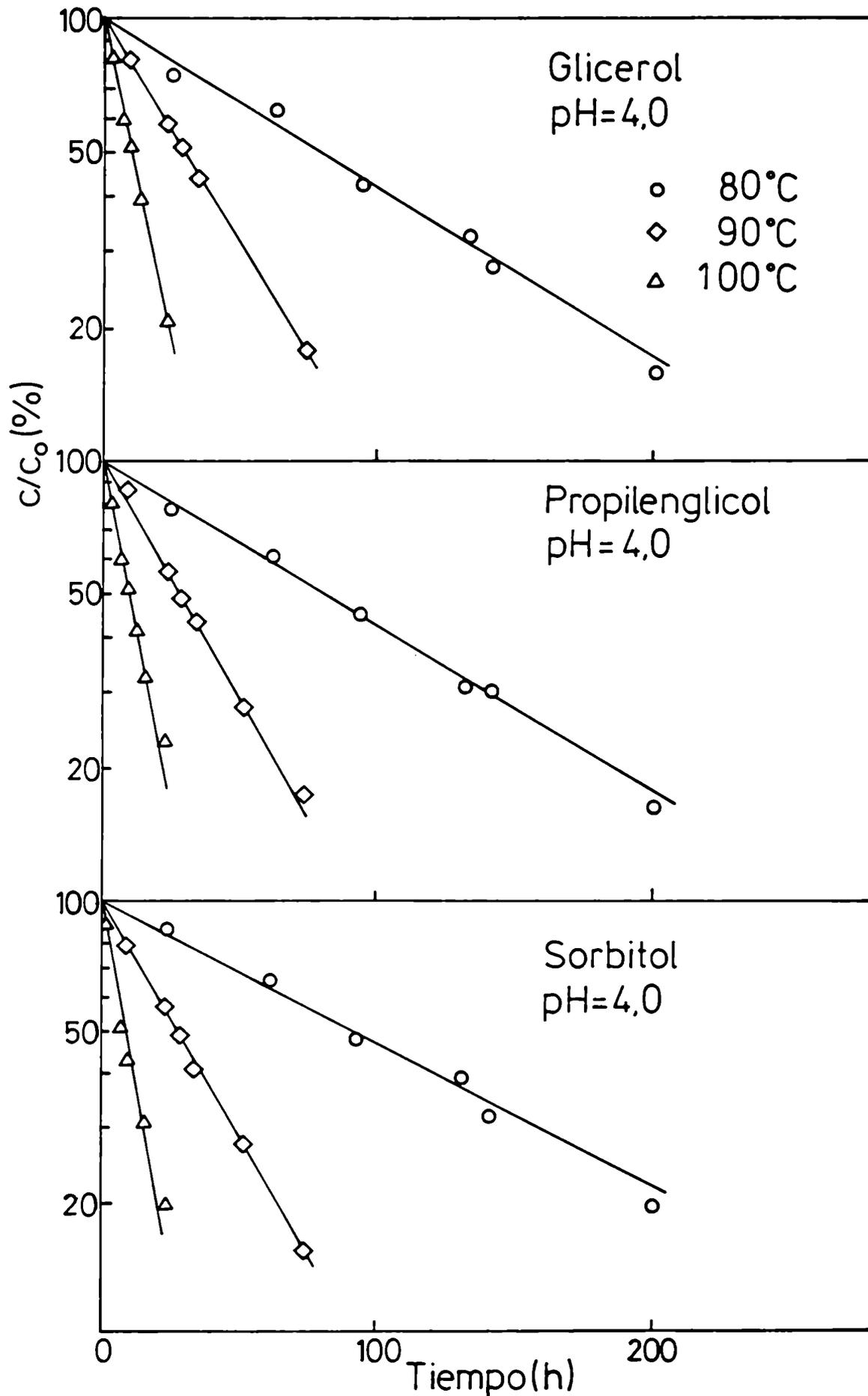
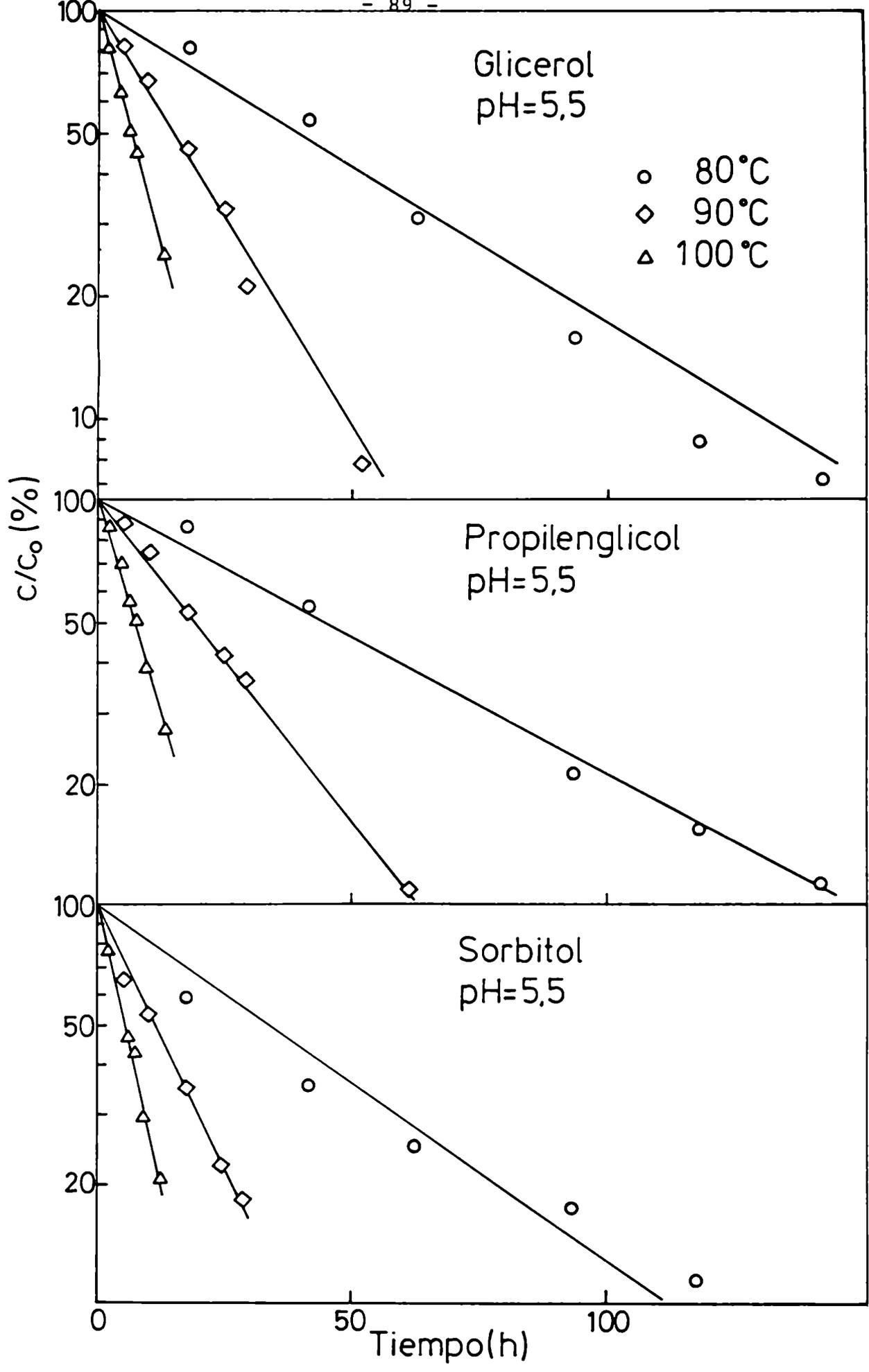


Figura 7

Retención de tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950

ajustada con glicerol, propilenglicol

o sorbitol, y pH 5,5



los sistemas modelo conteniendo glicerol, propilenglicol o sorbitol a ambos pH. Las retenciones para sistemas modelo con glucosa o sacarosa se muestran en las figuras 8 y 9. En todos los casos hay una buena concordancia entre los datos experimentales y la cinética de orden uno. La presencia de los diferentes humectantes tiene influencia sobre la velocidad de reacción. Por otra parte, al igual que el efecto mencionado a través de las figuras 2 y 3, la disminución del pH incrementa la retención de la vitamina, a iguales condiciones de tratamiento.

El valor de la constante de velocidad de reacción se calculó aplicando el método propuesto por Boquet (1984) detallado en el Apéndice A, para los distintos sistemas y condiciones de trabajo.

En la tabla 4.1 figuran los valores de k , así como los de desviación standard (S_k), error absoluto de la constante de velocidad (Δk) y error porcentual de k ($\epsilon\%$) cuya forma de evaluación figura también en el Apéndice A. El $\epsilon\%$ varió entre el 1 y el 15% para los sistemas modelo en que las concentraciones de tiamina se midieron por el método fluorométrico (sistemas modelo de a_w ajustada por la adición de NaCl, KCl, Na_2SO_4 , glicerol, propilenglicol, sorbitol y el sistema modelo control conteniendo sólo buffer). En cambio el $\epsilon\%$ resultó entre 9 y 29% para los sis-

///

Figura 8

Retención de tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950

ajustada con glucosa o sacarosa, y pH 4,0

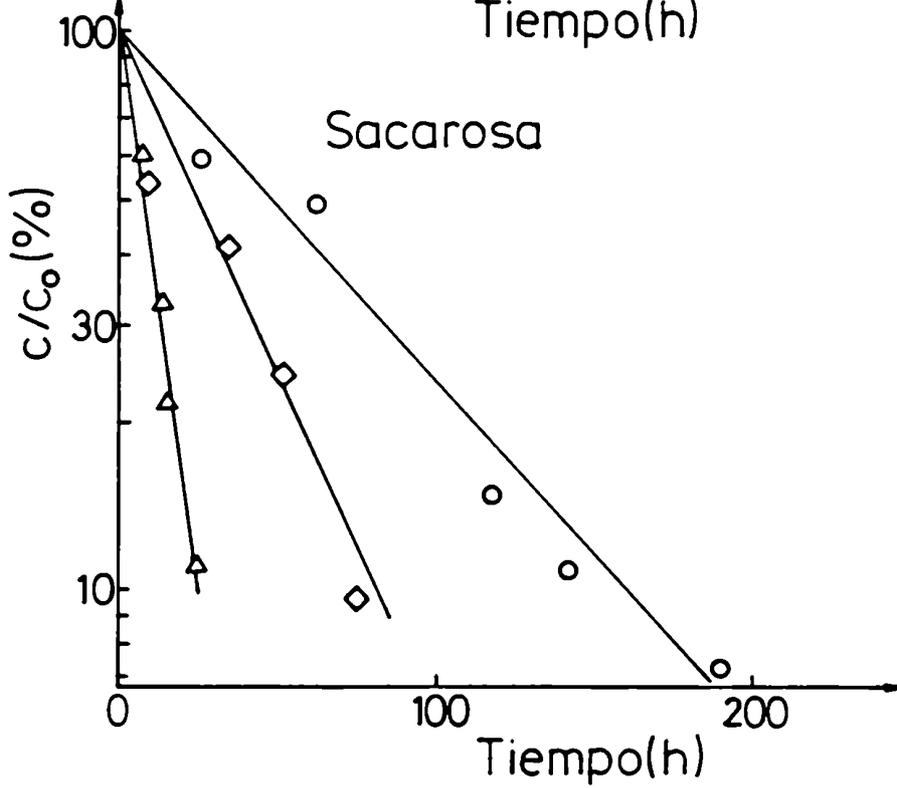
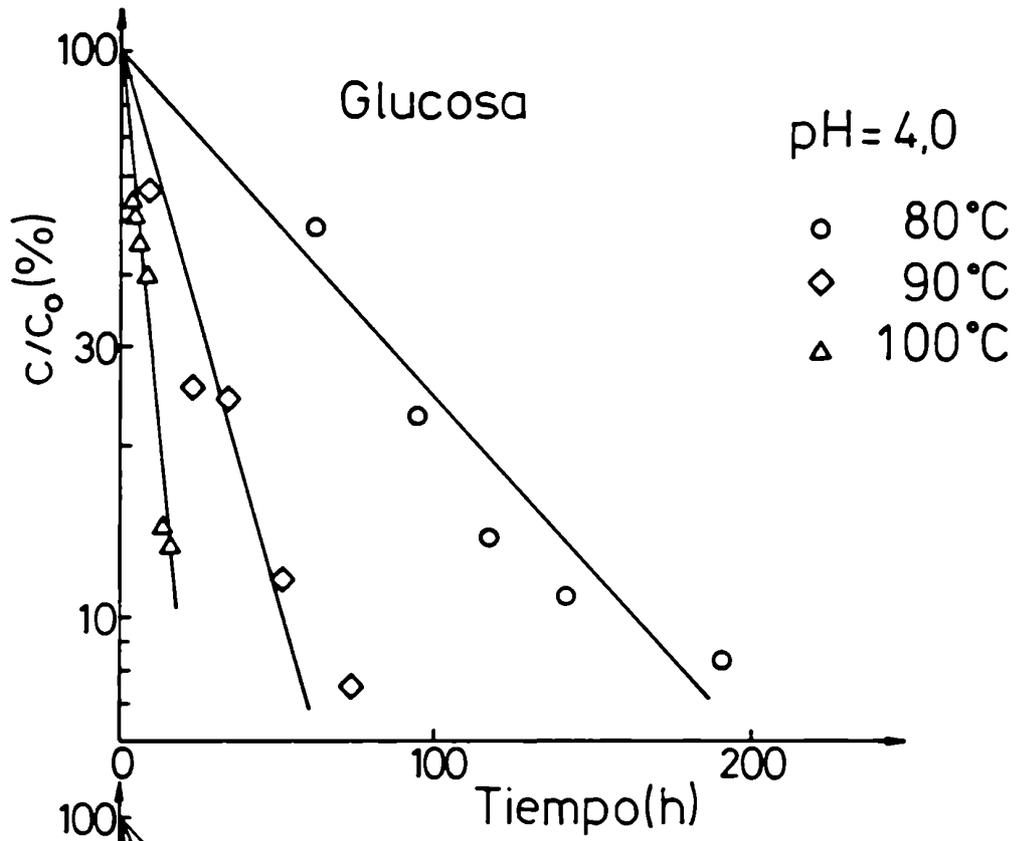


Figura 9

Retención de tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950
ajustada con glucosa o sacarosa, y pH 5,5

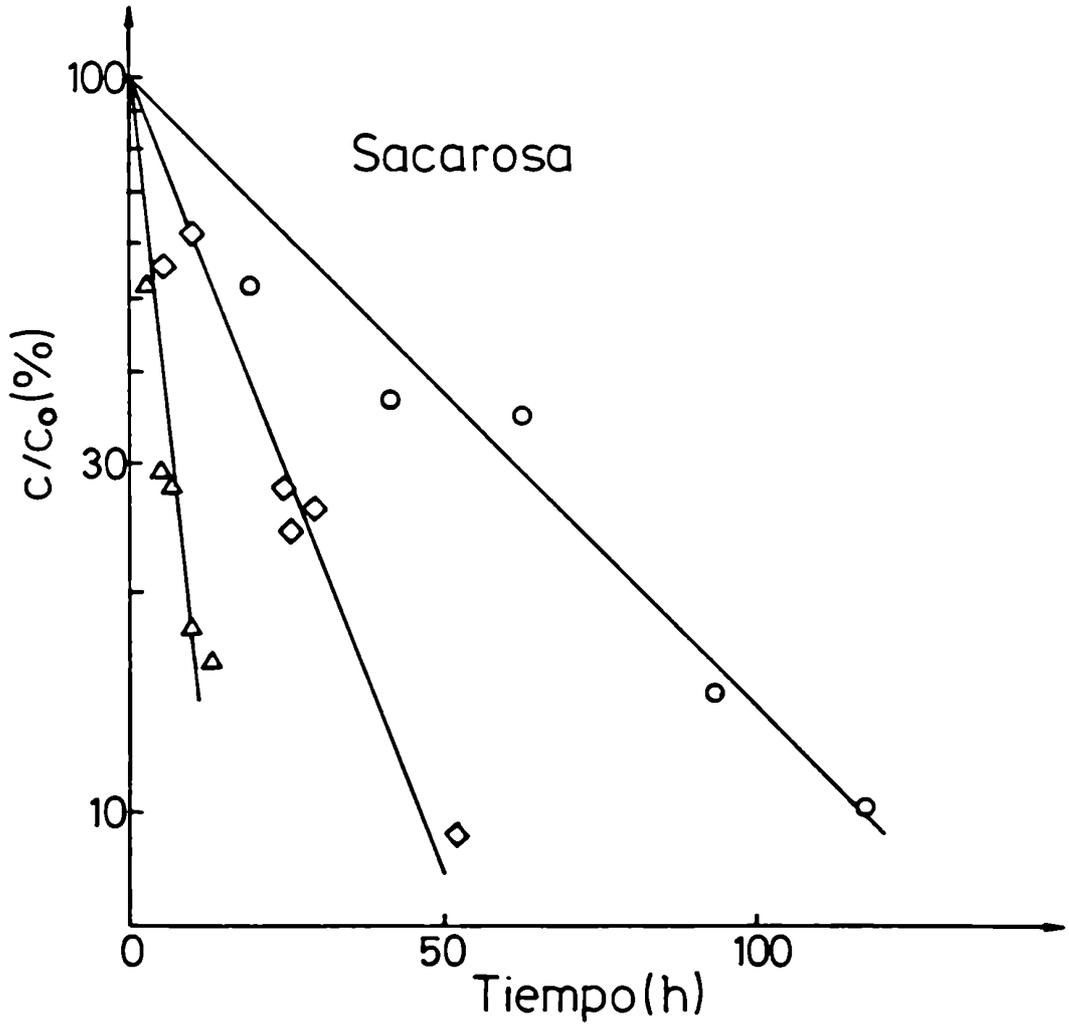
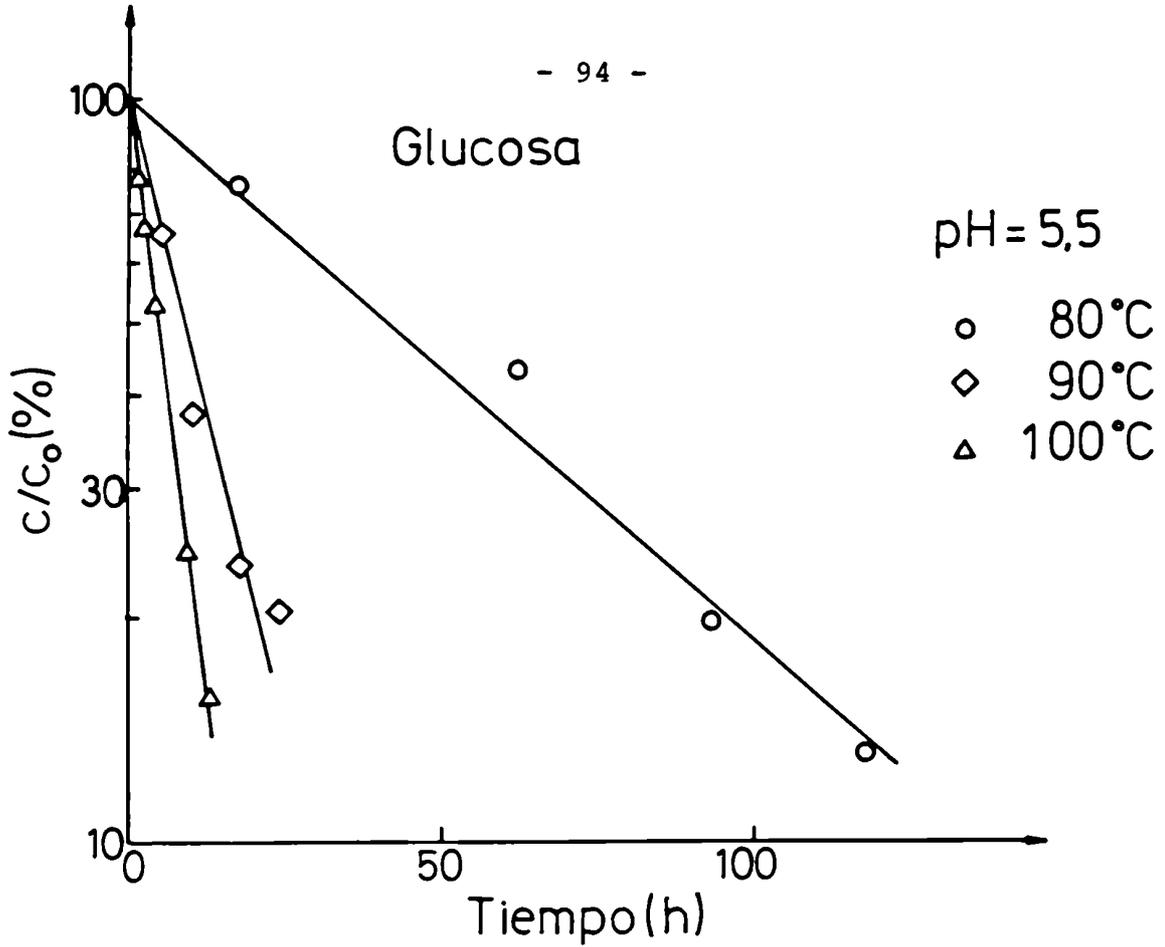


Tabla 4.1 Constantes de velocidad para la reacción de pérdida de tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950

1- Humectante: NaCl

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,024	11,43	0,001	5
	90	0,0107	3,01	0,0003	3
	80	0,0031	0,57	0,0001	3
5,5	100	0,065	35,55	0,004	6
	90	0,027	25,59	0,003	9
	80	0,0087	6,01	0,0005	5

2- Humectante: KCl

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,0281	7,61	0,0009	3
	90	0,0098	5,26	0,0005	5
	80	0,0030	1,27	0,0001	5

Continuación tabla 4.1

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
5,5	100	0,067	32,76	0,004	6
	90	0,021	12,55	0,001	7
	80	0,0080	6,80	0,0008	8

3- Humectante: Na₂SO₄

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,044	43,01	0,005	10
	90	0,0170	7,59	0,0008	5
	80	0,0052	2,75	0,0002	5
5,5	100	0,069	61,46	0,006	9
	90	0,0262	8,57	0,0009	3
	80	0,0081	3,64	0,0004	5

Continuación tabla 4.1

4- Sin humectante ($a_w \cong 1$)

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,047	21,49	0,002	4
	90	0,018	21,45	0,003	15
	80	0,0065	4,27	0,0005	8
5,5	100	0,093	43,08	0,004	4
	90	0,035	23,72	0,003	8
	80	0,014	9,49	0,001	8

5- Humectante: glicerol

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,069	17,43	0,002	3
	90	0,0232	3,19	0,0003	1
	80	0,0087	4,52	0,0004	5

Continuación tabla 4.1

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
5,5	100	0,106	43,94	0,005	4
	90	0,047	27,01	0,003	5
	80	0,017	20,21	0,002	11

6- Humectante: sorbitol

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,078	88,16	0,009	12
	90	0,0249	3,89	0,0004	1
	80	0,0075	8,38	0,0008	10
5,5	100	0,122	39,61	0,004	3
	90	0,060	40,73	0,004	7
	80	0,021	18,21	0,002	8

Continuación tabla 4.1

7- Humectante: propilenglicol

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,066	20,52	0,002	3
	90	0,025	11,24	0,001	4
	80	0,0085	2,51	0,0002	3
5,5	100	0,097	53,20	0,005	5
	90	0,036	24,71	0,002	6
	80	0,015	13,19	0,001	9

8- Humectante: glucosa

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,09	219,99	0,02	24
	90	0,044	52,48	0,006	12
	80	0,014	12,53	0,001	9

Continuación tabla 4.1

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
5,5	100	0,13	129,68	0,01	10
	90	0,08	82,75	0,01	11
	80	0,017	17,51	0,002	14

9- Humectante: sacarosa

pH	T (°C)	k (h ⁻¹)	S _k x10 ⁴	Δk (h ⁻¹)	ε%
4,0	100	0,084	74,21	0,009	11
	90	0,027	64,28	0,006	29
	80	0,014	18,19	0,002	14
5,5	100	0,19	303,8	0,03	17
	90	0,050	73,87	0,007	14
	80	0,020	30,43	0,003	16

temas modelo en los que las determinaciones de vitamina se efectuaron por el método microbiológico (sistemas modelo de a_w ajustada por el agregado de glucosa y de sacarosa), que al ser un método biológico acarrea mayor error en la evaluación de las constantes de velocidad.

Puede observarse que en todos los casos, tanto para sistemas con electrolitos o con no-electrolitos, las constantes de velocidad están influenciadas por la temperatura, el pH y el soluto empleado en la reducción de la a_w . Estos efectos serán considerados en detalle en los siguientes ítems.

Las figuras 10 y 11 resumen datos de retención de tiamina en varios alimentos y sistemas modelo de acuerdo con lo reportado por diversos autores. En estos gráficos se incluyen distintas carnes, vegetales, soluciones buffer y sistemas modelo cuya actividad de agua se controló por adición de diferentes solutos. Además, los mismos cubren un amplio rango de temperaturas (35°C - 138°C) y valores de pH (4 - 7). Puede verse a pesar de la diversidad de sistemas y condiciones que el gráfico de logaritmo de retención de tiamina versus tiempo da, en todos los casos una buena relación lineal, lo que indica que la velocidad de degradación de tiamina puede ser representada por un modelo de primer orden, al igual que lo hallado con los datos del presente trabajo.

///

Figura 10

Cinética de degradación de tiamina en alimentos
y sistemas modelos calentados a
altas temperaturas

Referencias:

- ◆ carne picada; 70°C (Skjöldebrand y col., 1983)
- ▲ carne picada; 98°C (Skjöldebrand y col., 1983)
- cerdo; 82°C (Rice y Beuk, 1945)
- cerdo; 99°C (Rice y Beuk, 1945)
- ▲ buffer fosfato + glicerol; $a_w = 0,96$; 84°C (Fox y col., 1982)
- buffer fosfato + glicerol; $a_w = 0,90$; 94°C (Fox y col., 1982)
- puré de hígado vacuno; 109°C (Feliciotti y Esselen, 1957)
- ◇ buffer fosfato; 109°C (Feliciotti y Esselen, 1957)
- puré de zanahorias; 129°C (Feliciotti y Esselen, 1957)
- buffer fosfato; 121°C (Mulley y col., 1975b)
- △ puré de arvejas en salmuera; 138°C (Mulley y col., 1975a)
- ◆ puré de arvejas; 127°C (Mulley y col., 1975a)

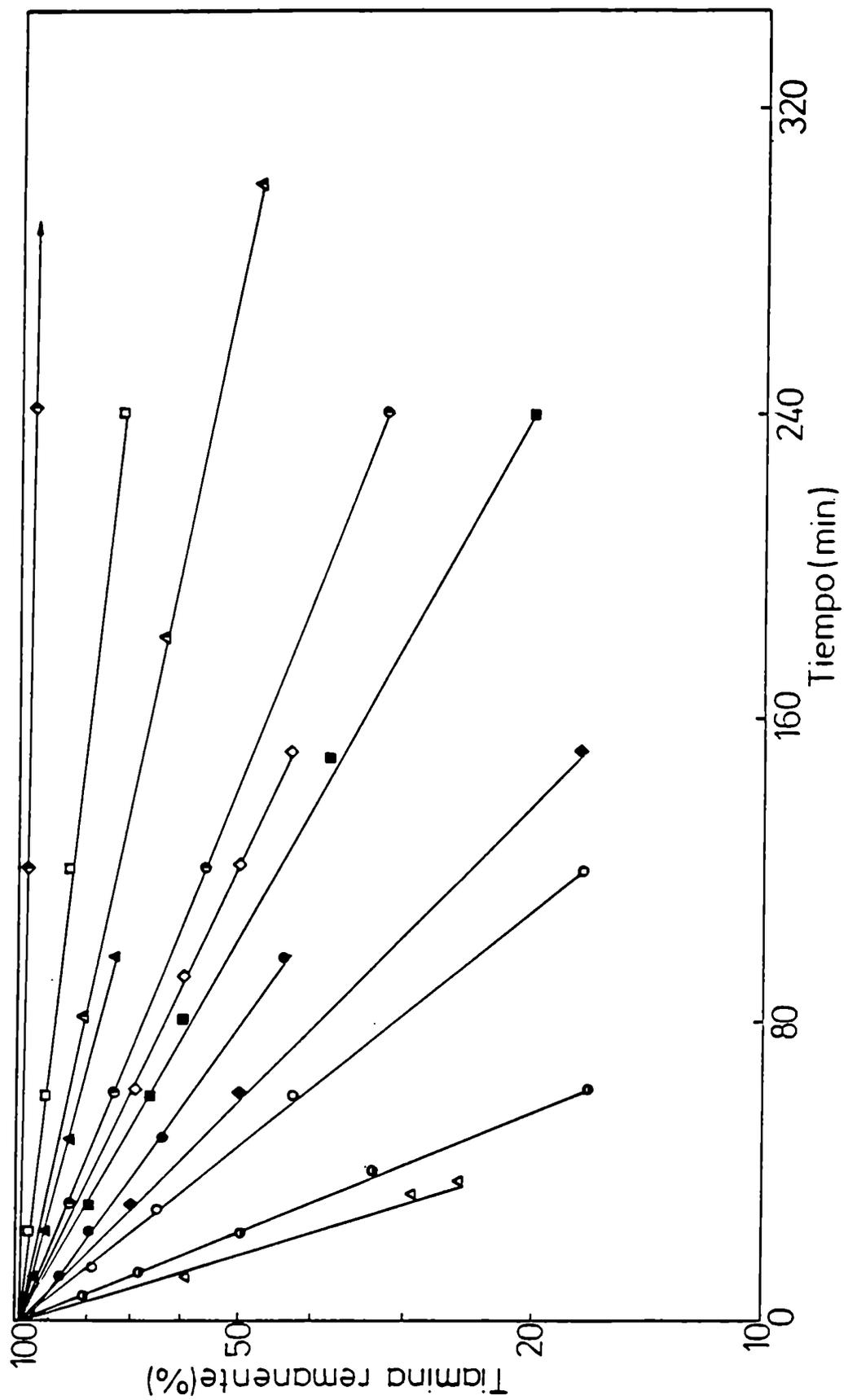
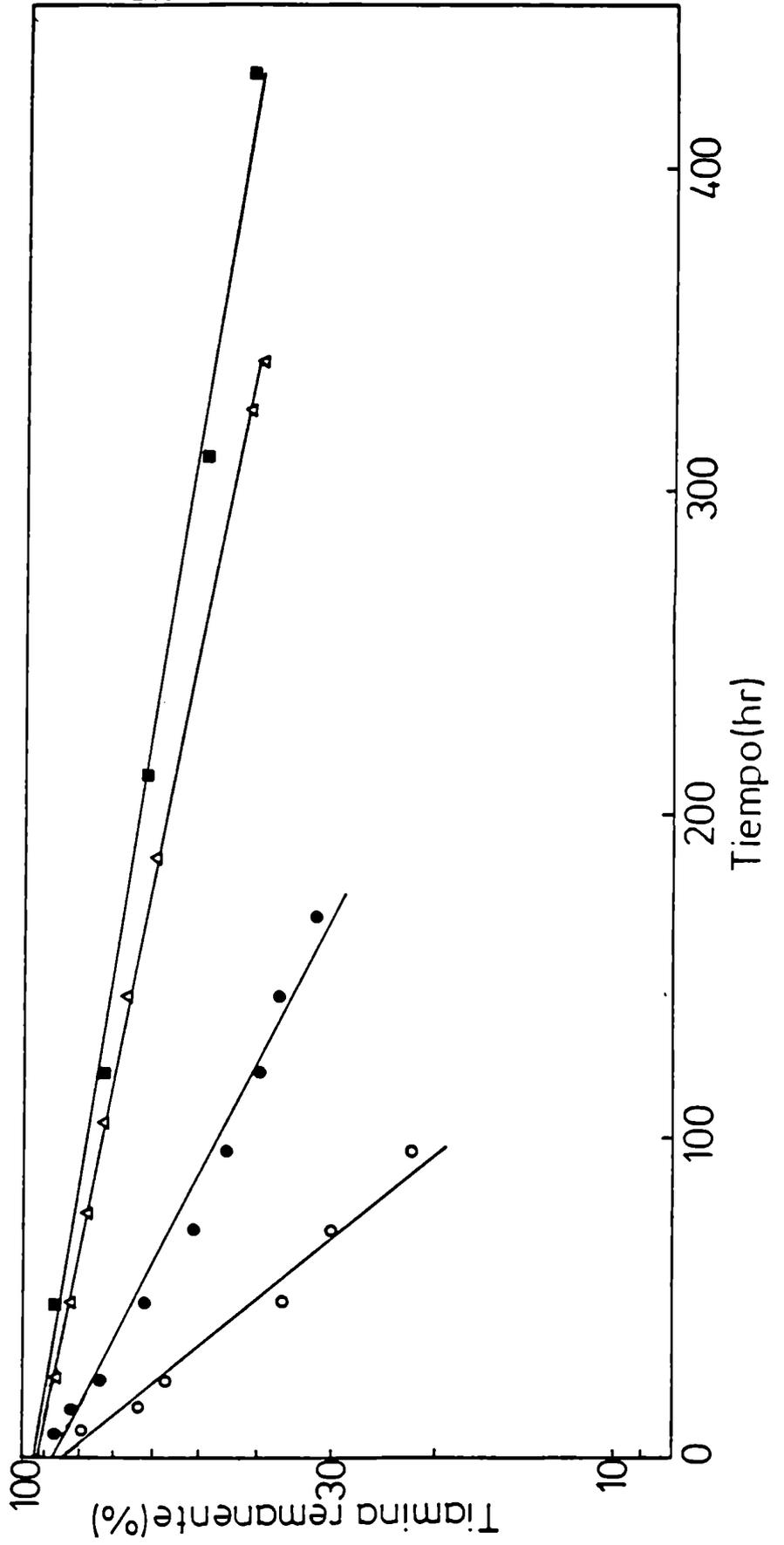


Figura 11

Cinética de degradación de tiamina en alimentos
y sistemas modelos calentados a temperatura
de almacenamiento acelerado

Referencias:

- buffer fosfato + Na_2SO_4 ; $a_w = 0,95$; 65°C (Fernández, 1984)
- △ buffer fosfato + glicerol; $a_w = 0,95$; 55°C (Fernández, 1984)
- cerdo; 54°C (Rice y Beuk, 1945)
- cerdo; 63°C (Rice y Beuk, 1945)



Se sabe que las vitaminas están sujetas a degradación a través de una variedad de mecanismos y que muchos factores pueden influenciar la contribución de cada mecanismo al proceso de degradación (Thompson, 1982). Entre estos factores están la temperatura, la concentración de sal o azúcar, el pH, el oxígeno y los catalizadores. De todas maneras, es notable que la cinética de degradación de tiamina en situaciones ampliamente variables tales como las mostradas en las figuras 10 y 11, sean todas de primer orden. Esto es estrictamente válido solamente para casos donde la retención de tiamina se mide para conversiones mayores del 50%, ya que un modelo de orden cero podría también aplicarse para describir los datos de destrucción para valores de retención más altos.

4.1.2. Energía de activación

En el punto 4.1.1. se ha observado que la temperatura es un parámetro que afecta significativamente la velocidad de degradación de la tiamina en los sistemas estudiados en este trabajo. El aumento de la temperatura de procesamiento tiene un efecto acelerante sobre las constantes de velocidad, de acuerdo con los valores presentados en la tabla 4.1 a 80°C, 90°C y 100°C para sistemas modelo de a_w 0,950 y para todos los humectantes estudia-

dos, como así también para el sistema modelo control (buffer) sin agregado de humectante.

El efecto de la temperatura en la cinética de pérdida de nutrientes ha sido revisado por Labuza y Riboh (1982). En particular, si la constante de degradación cumple con la ecuación de Arrhenius, dicho efecto puede expresarse a través de:

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \quad (4.8)$$

donde:

k_0 = factor de frecuencia (hr^{-1})

E_a = energía de activación (kcal/mol)

T = temperatura absoluta (K)

R = constante de los gases ideales ($1,987 \times 10^{-3}$ kcal/mol K).

En todos los casos estudiados se halló que la ecuación 4.8 ajusta la dependencia de la constante de velocidad de reacción con la temperatura.

Para el cálculo de los valores de energía de activación se siguió el procedimiento propuesto por Boquet (1984) tal como figura en el Apéndice B.

En las figuras 12 y 13 se representa gráficamente el

///

Figura 12

Efecto de la temperatura en las constantes de velocidad
en sistemas modelo de pH 5,5 y 4,0 con
propilenglicol como humectante

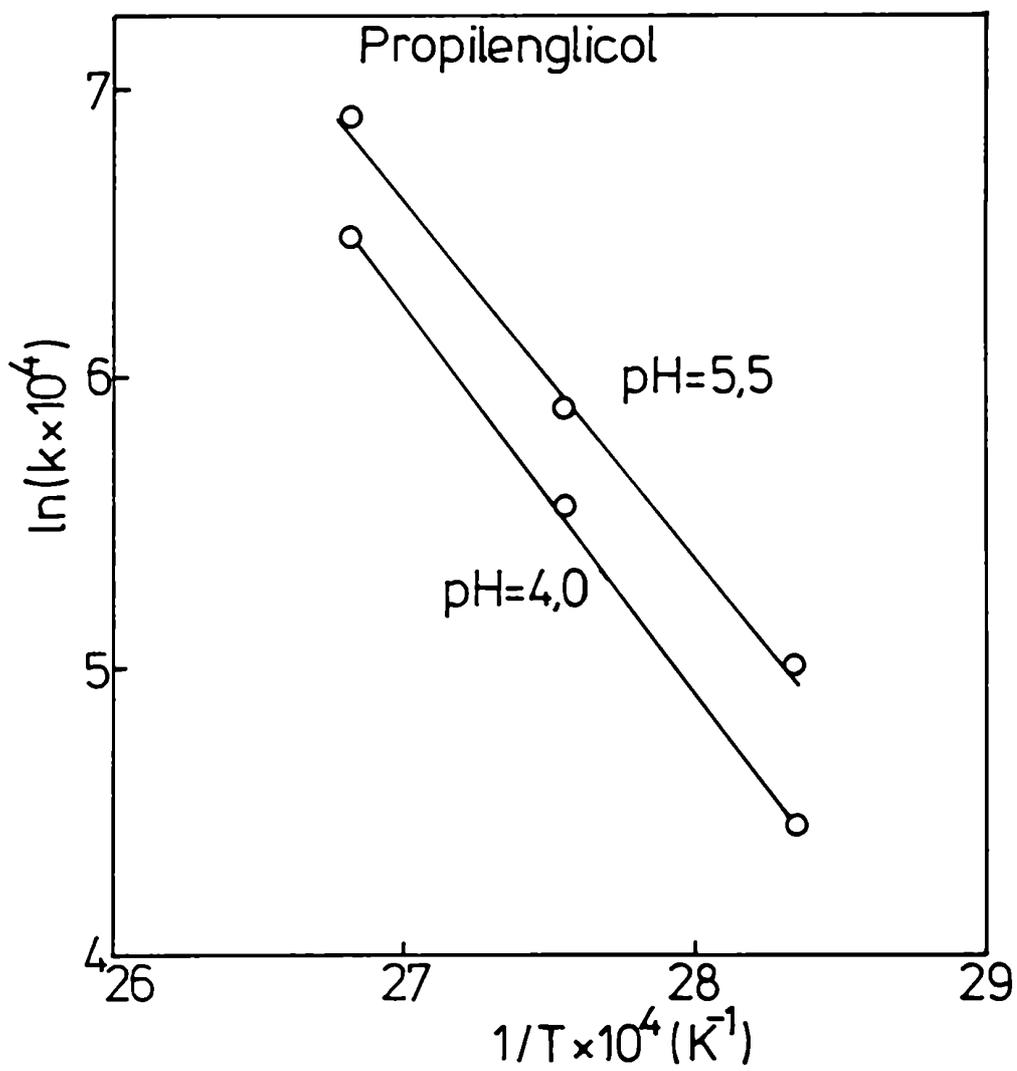
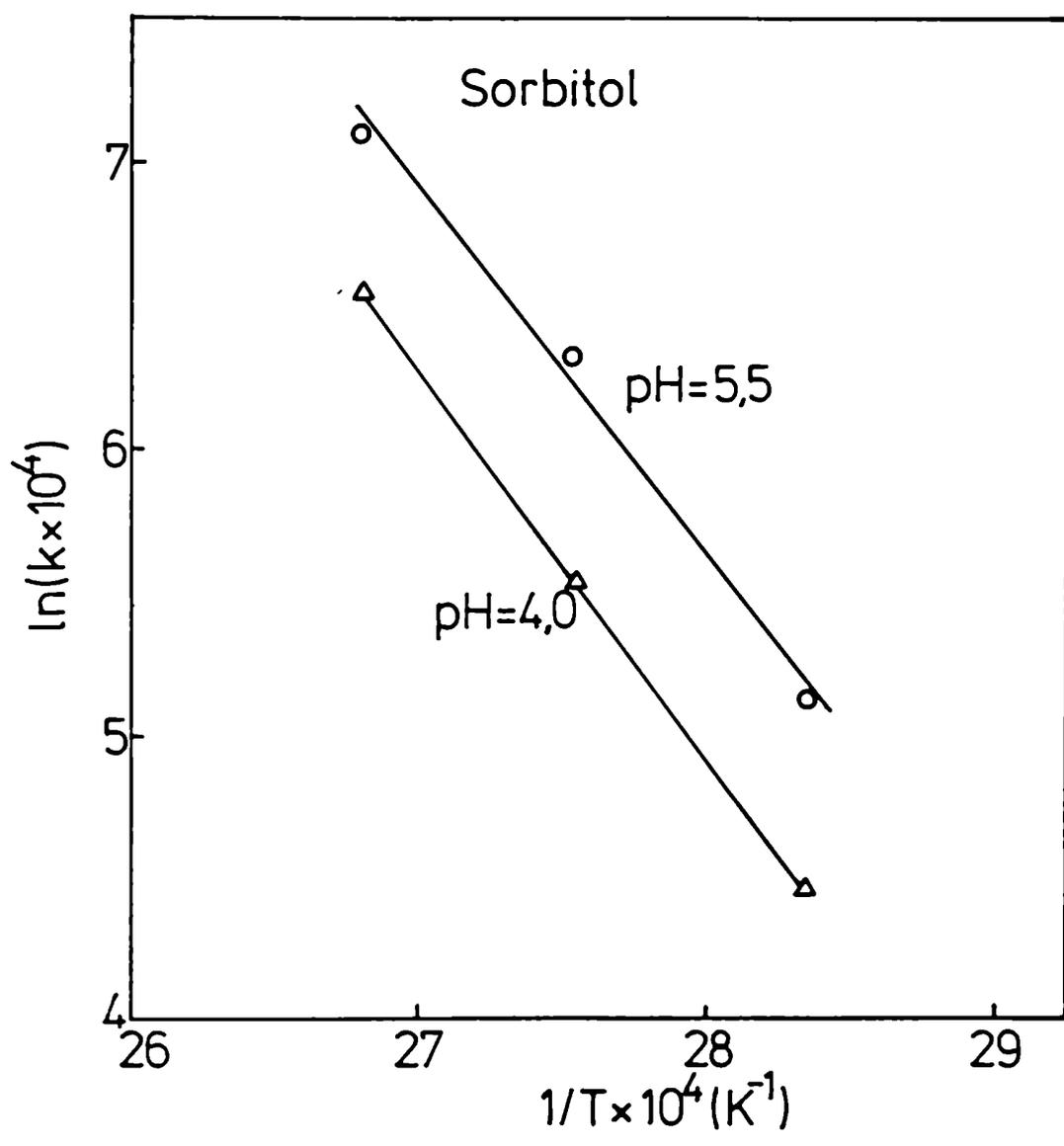


Figura 13

Efecto de la temperatura en las constantes de velocidad
en sistemas modelo de pH 5,5 y 4,0 con
sorbitol como humectante



ln de las constantes de velocidad en función de la inversa de la temperatura absoluta para los sistemas modelo de pH 5,5 y 4,0 con propilenglicol y sorbitol como humectantes respectivamente. Los valores calculados para los mismos de E_a , desviación standard (S_{E_a}), error absoluto (ΔE_a) y error porcentual ($\epsilon\%$) se reportan en la tabla 4.2. En el caso de estos sistemas modelo, las energías de activación de la reacción están comprendidas entre 22 y 31 kcal/mol y el $\epsilon\%$ asociado entre 5 y 17%. La tabla 4.2 incluye otro parámetro, el factor Q_{10} , que es una forma más práctica de visualizar el efecto de la temperatura en la velocidad de una reacción. Este factor se define como el aumento producido en la velocidad de la reacción al incrementarse 10 grados la temperatura. Su expresión matemática resulta:

$$Q_{10} = \text{antilog} \frac{2,189 E_a}{T(T + 10)} \quad (4.9)$$

E_a = energía de activación (cal/mol)

T = temperatura absoluta (K)

En el caso de los sistemas modelo con propilenglicol como humectante, los factores Q_{10} están comprendidos entre 2,4 y 2,9 y para los sistemas conteniendo sorbitol, dichos valores varían entre 2,3 y 3,4 (tabla 4.2).

///

Tabla 4.2 Energía de activación (E_a) y factores de Q_{10} correspondientes a la degradación térmica de tiamina en sistemas modelo cuya a_w fue ajustada a 0,950 con propilenglicol o sorbitol

1- Humectante: propilenglicol

pH	E_a (kcal/mol)	S_{Ea} $\times 10^2$	ΔE_a (kcal/mol)	$\epsilon\%$	Q_{10} (80°C-90°C)	Q_{10} (90°C-100°C)
4,0	27	56,15	1	5	2,9	2,7
5,5	24	129,44	3	13	2,6	2,4

2- Humectante: sorbitol

4,0	31	208,56	5	17	3,4	3,2
5,5	22	111,42	3	12	2,4	2,3

Las figuras 14, 15 y 16 representan la variación del \ln de las constantes de velocidad en función de la inversa de la temperatura absoluta para sistemas modelo sin humectante ($a_w \approx 1$) y conteniendo KCl y NaCl respectivamente, a valores de pH 4,0 y 5,5. En estas figuras se representa también el valor de las k a 55°C (para sistemas modelo de pH 5,5) halladas en este trabajo para evaluar el efecto de la temperatura en un rango más amplio, desde 100°C hasta temperaturas de almacenamiento acelerado. Dichos valores se reportan en la tabla 4.3.

Como puede observarse en estos gráficos, la ecuación de Arrhenius se cumple para estos sistemas en todo el rango de temperaturas considerado (55°C a 100°C a pH 5,5 y 80°C-100°C a pH 4,0).

La tabla 4.4 reporta los valores de E_a y su $\epsilon\%$, así como los Q_{10} derivados para los sistemas modelo descritos a pH 5,5 y a pH 4,0. Los valores de E_a para los sistemas de pH 4,0, que fueron evaluados en el rango 80°C - 100°C son de 29 kcal/mol, con un error asociado que varía entre 4 y 6%. En el caso de los mismos sistemas modelo, pero de pH 5,5, las energías de activación, calculadas entre 55°C y 100°C, varían entre 27 y 28 kcal/mol, con un error del 1 al 2%. Los factores Q_{10} , calculados entre 80°C y 100°C oscilaron entre 2,8 y 3,1 teniendo en cuenta todos los sistemas considerados en la tabla 4.4.

///

Figura 14

Efecto de la temperatura en las constantes de velocidad

en sistemas modelo con buffer fosfato

(sin humectante)

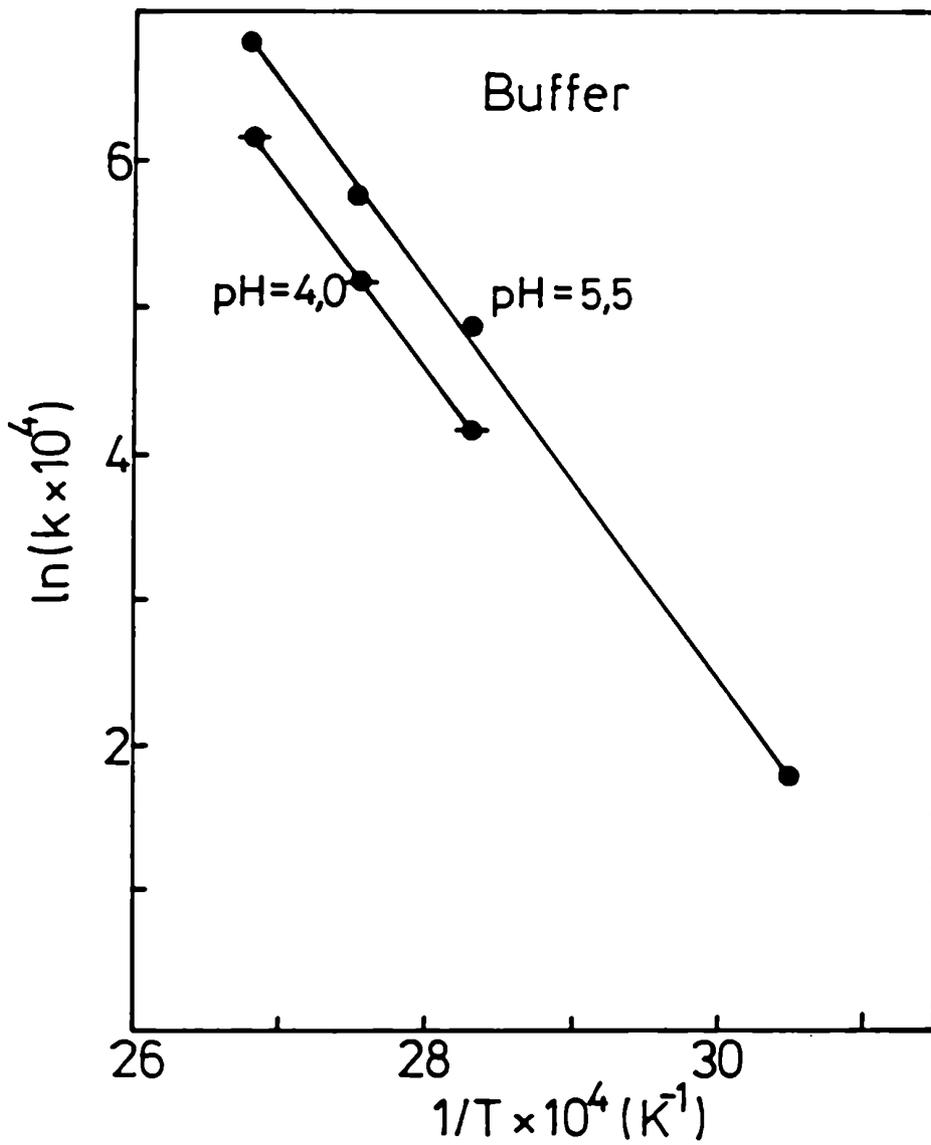


Figura 15

Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad
en sistemas modelo con KCl como humectante

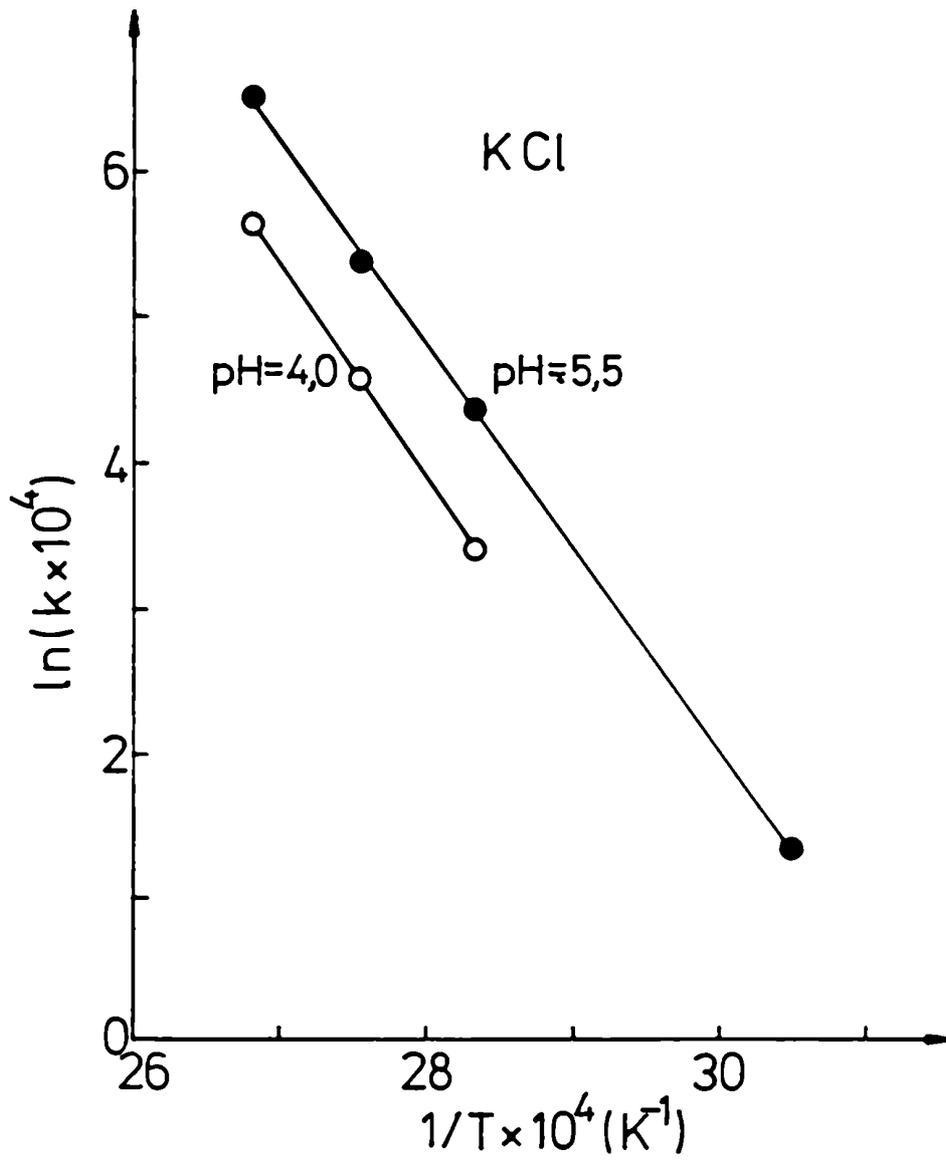


Figura 16

Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad
en sistemas modelo con NaCl como humectante

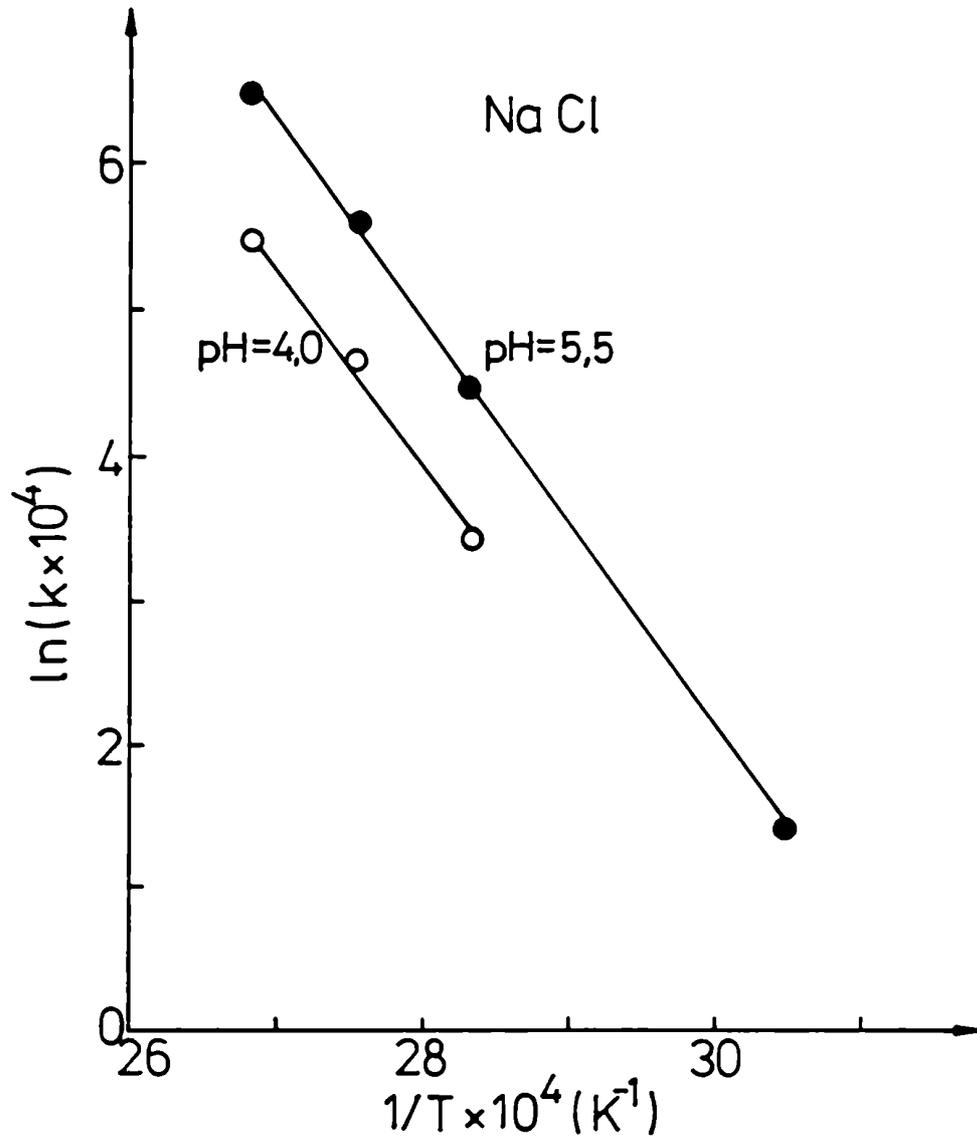


Tabla 4.3 Constantes de velocidad a 55°C para sistemas
modelo de pH 5,5

Sistema	$k \times 10^3$ (h^{-1})	S_k $\times 10^5$	$\Delta k \times 10^3$ (h^{-1})	$\epsilon\%$
Sin humectante ($a_w \approx 1$)	0,60	2,62	0,02	4
NaCl	0,43	3,04	0,02	3
KCl	0,383	0,84	0,006	2

Tabla 4.4 Energía de activación (E_a) y factores Q_{10} correspondientes a la degradación térmica de tiamina en sistemas modelo cuya a_w fue ajustada a 0,950 con NaCl o KCl y en sistema modelo sin humectante (buffer)

pH	E_a (kcal/mol)	S_{Ea} $\times 10^2$	ΔE_a (kcal/mol)	$\epsilon\%$	Q_{10}	
					(80°C-90°C)	(90°C-100°C)
<u>1- Humectante: NaCl</u>						
4,0	29	56,85	1	5	3,1	2,9
5,5	27,4	32,81	0,5	2	2,9	2,8
<u>2- Humectante: KCl</u>						
4,0	29	64,88	2	6	3,1	2,9
5,5	27,7	25,24	0,4	1	3,0	2,8
<u>3- Sin humectante</u>						
4,0	29	104,57	3	4	3,1	2,9
5,5	27,4	33,26	0,5	2	2,9	2,8

Por otra parte, en las figuras 17 y 18 se representa gráficamente el efecto de la temperatura en las constantes de velocidad en sistemas modelo de pH 5,5 con glicerina y Na_2SO_4 como humectantes ($a_w = 0,950$) entre 100°C y 45°C . Algunos datos de constantes de velocidad para estos sistemas, a pH 5,5 y a 45°C , 55°C , 60°C y 65°C , corresponden al trabajo de Fernández (1984). Puede verse que entre las temperaturas más altas y las más bajas la dependencia de la velocidad de la reacción con este parámetro es la misma, con lo cual se pudieron calcular los valores de E_a en todo el rango de temperaturas estudiado. Dichos valores se muestran en la tabla 4.5, que incluye también los correspondientes a los mismos sistemas modelo pero de pH 4,0, en los cuales la evaluación se hizo sólo en el rango de procesamiento (80°C - 100°C). En este último caso las energías de activación estuvieron comprendidas entre 28 y 29 kcal/mol, con errores entre 6 y 11%. Para los sistemas de pH 5,5, en el rango de temperaturas de 45°C a 100°C , la energía de activación resultó de 28 kcal/mol con errores del 1%.

Los factores Q_{10} , evaluados para temperaturas entre 80°C y 100°C varían entre 2,8 y 3,1.

En las figuras 19 y 20 se representa el ln de las constantes de velocidad en función de la inversa de la temperatura

///

Figura 17

Efecto de la temperatura en las constantes de velocidad
en sistemas modelo con glicerol como humectante

Referencias:

- Fernández (1984)
- Este trabajo

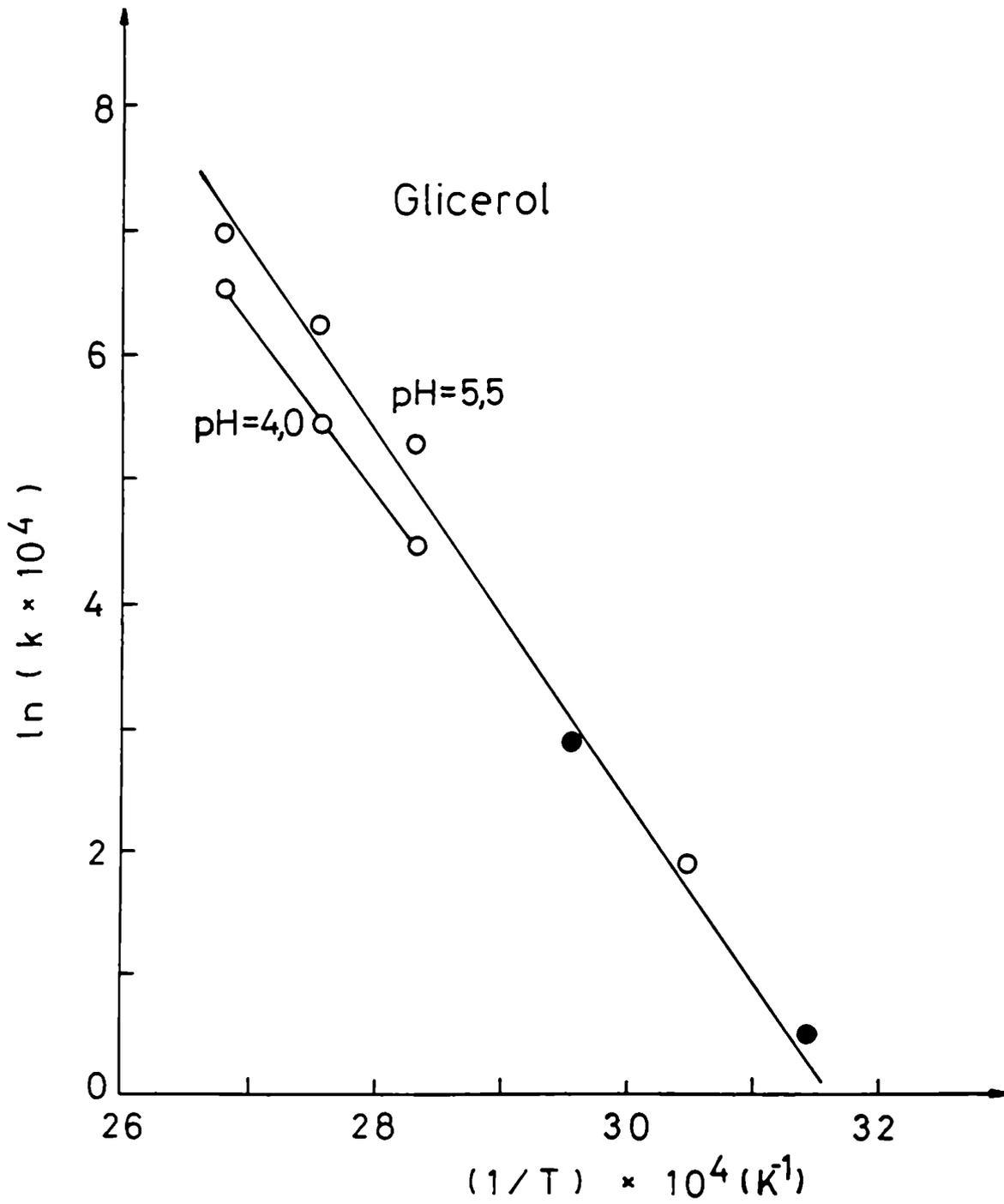


Figura 18

Efecto de la temperatura en las constantes de velocidad
en sistemas modelo con Na_2SO_4 como humectante

Referencias:

- Fernández (1984)
- Este trabajo

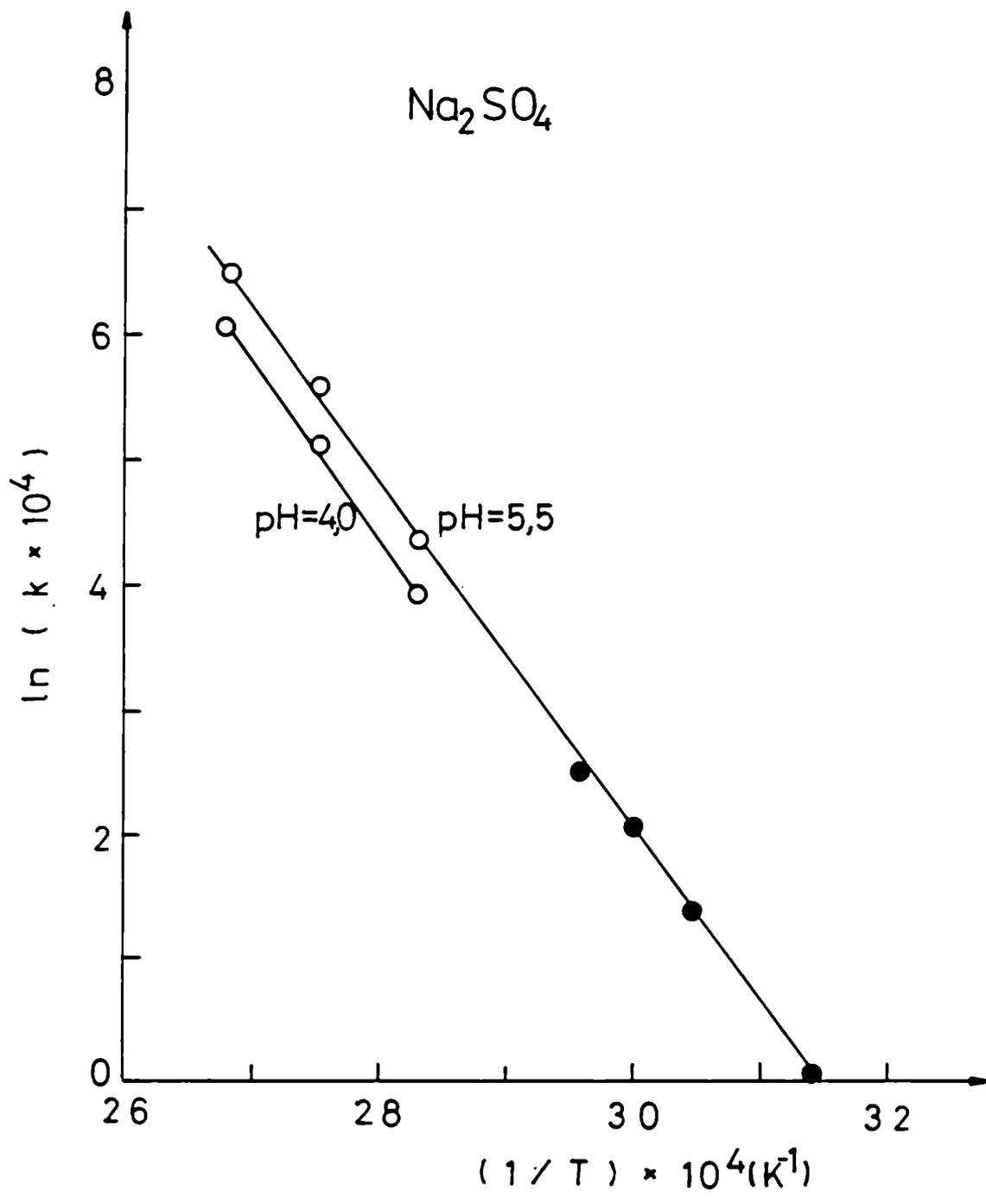


Tabla 4.5 Energía de activación (E_a) y factores Q_{10} correspondientes a la degradación térmica de tiamina en sistemas modelo de buffer fosfato cuya a_w fue ajustada a 0,950 con glicerol o Na_2SO_4

1- Humectante: glicerol

pH	E_a (kcal/mol)	S_{Ea} $\times 10^2$	ΔE_a (kcal/mol)	$\epsilon\%$	Q_{10} (80°C-90°C)	Q_{10} (90°C-100°C)
4,0	28	63,71	2	6	3,0	2,8
5,5	27,9	21,63	0,2	1	3,0	2,8

2- Humectante: Na_2SO_4

4,0	29	130,27	3	11	3,1	2,9
5,5	28,1	27,99	0,3	1	3,0	2,8

Figura 19

Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad
en sistemas modelo de pH 4,0 y 5,5
con glucosa como humectante

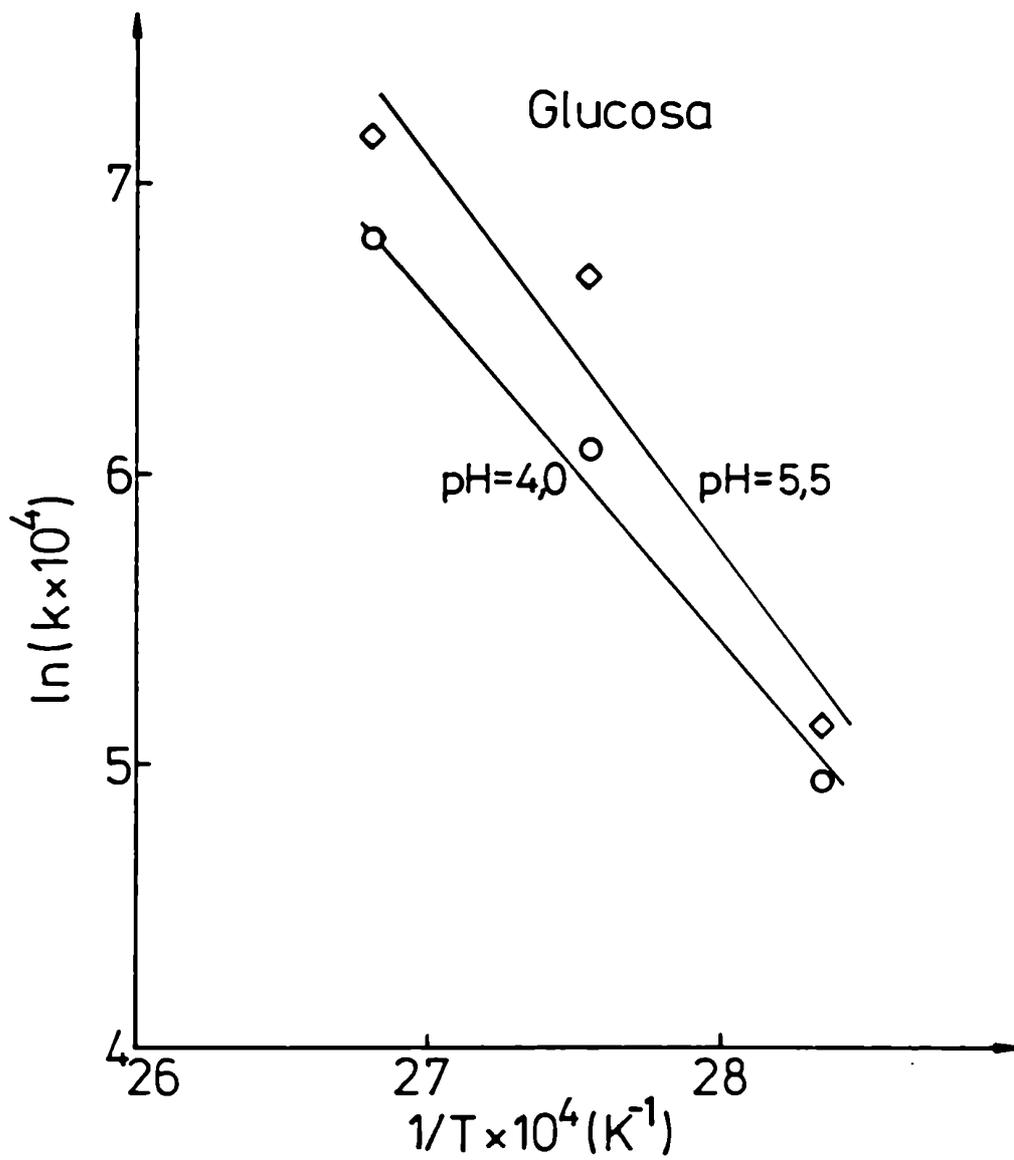
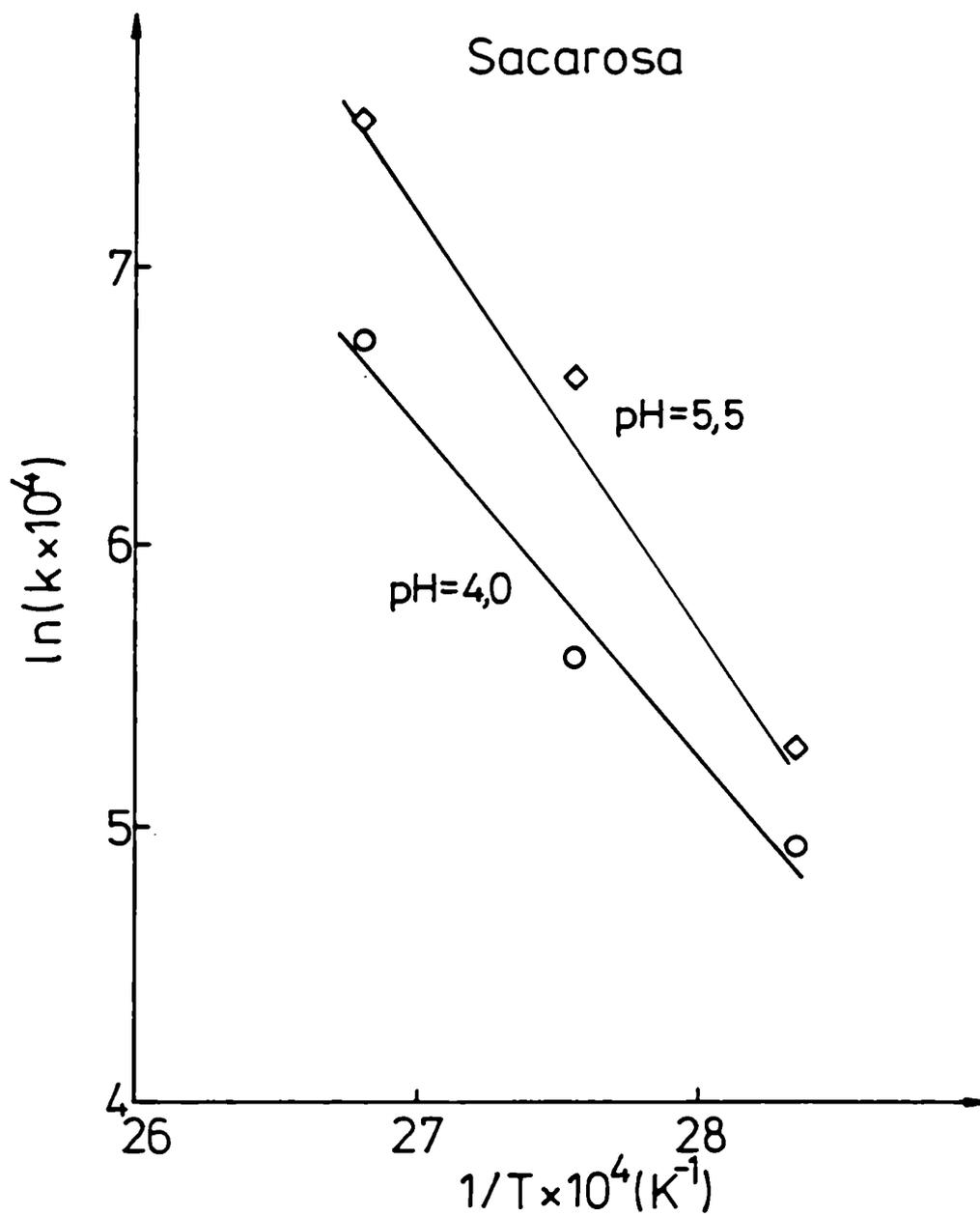


Figura 20

Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad
en sistemas modelo de pH 4,0 y 5,5
con sacarosa como humectante



absoluta para sistemas modelo de a_w 0,950 ajustada con glucosa o sacarosa, de pH 4,0 y 5,5, en el rango de temperaturas de 80°C a 100°C. En estas condiciones, a pesar de los errores involucrados en la determinación de las constantes de velocidad (punto 4.1.1), se verifica la ley de Arrhenius para la dependencia con la temperatura. Los valores de E_a y Q_{10} derivados se reportan en la tabla 4.6. Los valores de E_a varían entre 24 y 29 kcal/mol, con errores del 17 al 27%. Los mismos son mayores que los correspondientes al resto de sistemas estudiados, debido a que en su cálculo intervienen los errores asociados a las k , determinadas en estos casos a través del método microbiológico de análisis de la vitamina. Aún así estos errores están dentro de los establecidos por Labuza y Riboh (1982) para el valor de la E_a en la reacción de pérdida de nutrientes; dichos autores mencionan errores del 25% asociados a estos cálculos en alimentos. Los factores Q_{10} derivados varían en estos casos entre 2,4 y 3,1.

Los resultados presentados en las tablas 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 indican que los valores de las energías de activación y de Q_{10} son bastante independientes del humectante presente en el sistema, así como del pH, en el rango de temperaturas de estudio (desde almacenamiento acelerado a procesamiento). Las E_a varían

///

Tabla 4.6 Energía de activación (E_a) y factores Q_{10} correspondientes a la degradación térmica de tiamina en sistemas modelo de buffer fosfato cuya a_w fue ajustada a 0,950 con glucosa o sacarosa

1- Humectante: glucosa

pH	E_a (kcal/mol)	S_{E_a} $\times 10^2$	ΔE_a (kcal/mol)	$\epsilon\%$	Q_{10} (80°C-90°C)	Q_{10} (90°C-100°C)
4,0	26	284,02	7	27	2,8	2,6
5,5	27	187,14	5	17	2,9	2,7

2- Humectante: sacarosa

4,0	24	207,67	5	22	2,6	2,4
5,5	29	293,42	7	25	3,1	2,9

entre 22 y 31 kcal/mol; los errores asociados al cálculo de las mismas lo hacen entre el 1% y el 17% llegando al 27% para sistemas modelo con azúcares como humectante, por las razones anteriormente expuestas. Los factores Q_{10} de la reacción, evaluados entre 80°C y 100°C varían entre 2,4 y 3,4.

A través de ambos valores (E_a y Q_{10}) puede decirse que la reacción de degradación térmica de tiamina está influenciada significativamente por variaciones de temperatura. El aumento de la temperatura de procesamiento produce un aumento considerable en la velocidad de reacción.

La tabla 4.7 compara los valores de energía de activación para la pérdida de tiamina en una amplia variedad de alimentos, soluciones buffer y sistemas modelo. Los valores de actividad de agua indicados en la tabla 4.7 para carnes, leche y vegetales fueron estimados de acuerdo a Chirife y Ferro Fontán (1982). Las a_w de sistemas modelo son valores medidos y las a_w de los buffers se calcularon de datos de Pitzer y Mayorga (1973). Los datos muestran que todos los valores de E_a varían entre 22 kcal/mol y 32 kcal/mol, estando la mayoría de ellos entre 26 kcal/mol y 30 kcal/mol. Estos valores concuerdan con los hallados en este trabajo. Además resultan bastante similares entre sí a pesar de la variada naturaleza y composición química de los sistemas (carnes,

///

Tabla 4.7 Comparación de las E_a para la degradación de tiamina en alimentos y sistemas modelo de alta a_w

Sistema	a_w	pH	Rango de temperatura (°C)	E_a (kcal/mol)	Referencia
Buffer fosfato	≈ 0,99	4,5	109-149	29,0	Feliciotti y Esselen(1957)
		5,0	109-149	28,0	Feliciotti y Esselen(1957)
		5,5	109-149	28,0	Feliciotti y Esselen(1957)
		6,0	109-149	29,4	Feliciotti y Esselen(1957)
		6,5	109-149	31,7	Feliciotti y Esselen(1957)
		7,0	109-149	29,8	Feliciotti y Esselen(1957)
		6,0	121-138	29,4	Mulley y col. (1975,a)
		5,0	84 y 94	31	Fox y col. (1982)
		7,0	84 y 94	27	Fox y col. (1982)

136

Continuación tabla 4.7

Sistema	a_w	pH	Rango de temperatura (°C)	E_a (kcal/mol)	Referencia
Modelo, buffer					
fosfato + glicerol	0,96	5	84 y 94	31	Fox y col. (1982)
	0,93	5	84 y 94	26	Fox y col. (1982)
	0,90	5	84 y 94	28	Fox y col. (1982)
	0,96	7	84 y 94	27	Fox y col. (1982)
	0,93	7	84 y 94	26	Fox y col. (1982)
	0,90	7	84 y 94	26	Fox y col. (1982)
+Na ₂ SO ₄	0,95	5,5-6,5	45-65	23,7-26,5	Fernández (1984)
+glicerol	0,90	5,5-6,5	45-65	21,7-22,8	Fernández (1984)
	0,95	5,5-6,5	45-65	23,6-24,5	Fernández (1984)

Continuación tabla 4.7

Sistema	a_w	pH	Rango de temperatura (°C)	E_a (kcal/mol)	Referencia
Puré de corazón vacuno	≈ 0,99	6,10	109-149	27,8	Feliciotti y Esselen(1957)
Puré de hígado vacuno	≈ 0,99	6,07	109-149	28,5	Feliciotti y Esselen(1957)
Puré de carne de cordero	≈ 0,99	6,18	109-149	27,7	Feliciotti y Esselen(1957)
Puré de carne de cerdo	≈ 0,99	6,18	109-149	27,4	Feliciotti y Esselen(1957)
Carne vacuna picada	≈ 0,99	Natural	70-98	27,1	Skjöldebrand y col. (1983)
Puré de carne vacuna	≈ 0,99	Natural	121-138	27,4	Mulley y col. (1975,a)
Leche entera	≈ 0,995	Natural	120-150	26,0	Bayoumi y Reuter (1980)
Puré de zanahorias	≈ 0,99	6,13	109-149	28,3	Feliciotti y Esselen(1957)
Puré de porotos verdes	≈ 0,99	5,83	109-149	28,5	Feliciotti y Esselen(1957)
Puré de arvejas	≈ 0,99	6,75	109-149	28,1	Feliciotti y Esselen(1957)

Continuación tabla 4.7

Sistema	a_w	pH	Rango de temperatura (°C)	E_a (kcal/mol)	Referencia
Puré de espinacas	≈ 0,99	6,70	109-149	28,2	Feliciotti y Esselen(1957)
Puré de arvejas	≈ 0,99	Natural	121-138	27,5	Mulley y col. (1975,a)
Puré de arvejas en salmuera	≈ 0,99	Natural	121-138	27,0	Mulley y col. (1975,a)
arvejas en salmuera	≈ 0,99	Natural	104-133	20*	Bendix y col. (1951)

* Calculado a partir de los datos experimentales de los autores

vegetales, leche, soluciones buffer y sistemas modelo), y del amplio rango de temperaturas, desde estudios de almacenamiento acelerado (35°C - 55°C) hasta esterilización (109°C - 149°C). Los límites de confianza para la E_a no están dados aquí porque en muchos casos no se conoce el error de los datos de literatura. Como se mencionó anteriormente, el error en el cálculo de E_a para la pérdida de nutrientes en alimentos es usualmente de 25% o aún mayor (Labuza y Riboh, 1982). Así, la concordancia observada en la tabla 4.7 es de alguna manera sorprendente.

A pesar de que es bien sabido que los parámetros cinéticos determinados en sistemas modelo o soluciones buffer deben ser verificados en los sistemas alimenticios sujetos a procesos reales, de este análisis puede concluirse que las soluciones buffer o los sistemas modelo se comportan en forma similar a los alimentos en términos de valores de energía de activación. Así, el pequeño rango de variación en E_a para varios tipos de alimentos y soluciones buffer o modelo, permite la estimación del efecto de cambio de temperatura sobre la pérdida de tiamina en alimentos para los cuales la exacta dependencia con la temperatura no ha sido determinada previamente.

4.2. Influencia del pH

En la figura 21 se representa gráficamente el porcentaje de tiamina remanente en función del tiempo de calentamiento a 90°C, para sistemas modelo de a_w 0,950 que contienen sorbitol, un no-electrolito, como humectante, a pH 4,0 y 5,5. A través de la misma puede observarse que el pH influye significativamente sobre la velocidad de destrucción de tiamina. Un aumento del pH del sistema produce un incremento en la degradación de la vitamina. En la figura 22 se representa la retención de tiamina a 80°C para sistemas modelo de a_w 0,950 que contienen un electrolito, Na_2SO_4 , como humectante a pH 4,0 y 5,5. En la misma se observa un comportamiento similar de la velocidad de degradación con el pH que el ya descrito para el sistema modelo con sorbitol, o sea la mayor inestabilidad de la tiamina al aumentar el pH.

Para el resto de los sistemas modelo estudiados y a todos los valores de temperatura se encuentra un comportamiento similar de k con la variación de pH, de acuerdo con los valores de constantes de velocidad presentados en la tabla 4.1.

La influencia del pH sobre la velocidad de degradación térmica de la tiamina, es decir el incremento de su destrucción al aumentar la alcalinidad del sistema, se reconoció prácticamente

Figura 21

Retención de tiamina para sistemas modelo

de $a_w = 0,950$, ajustada con sorbitol,

a pH 4,0 y 5,5

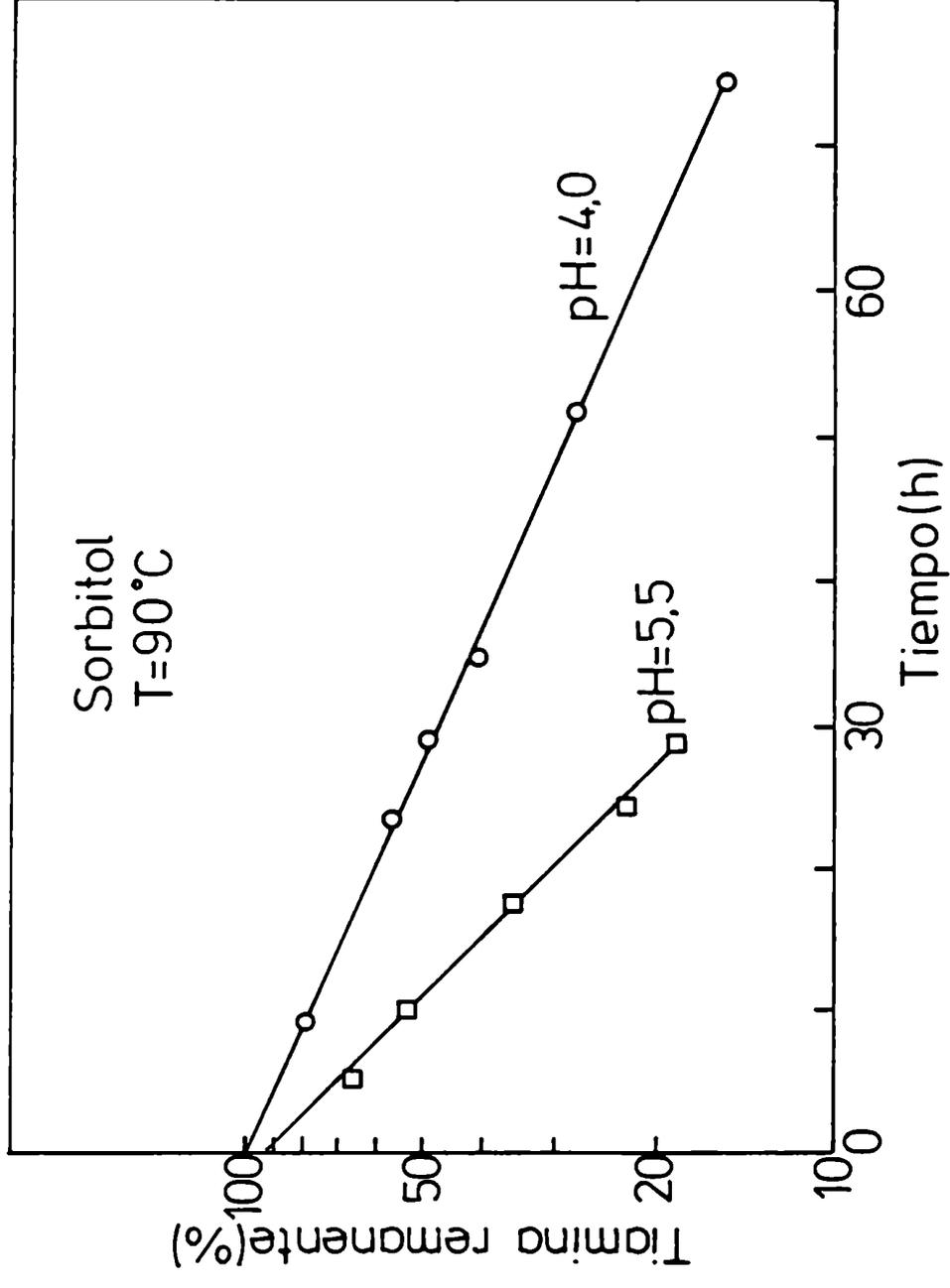
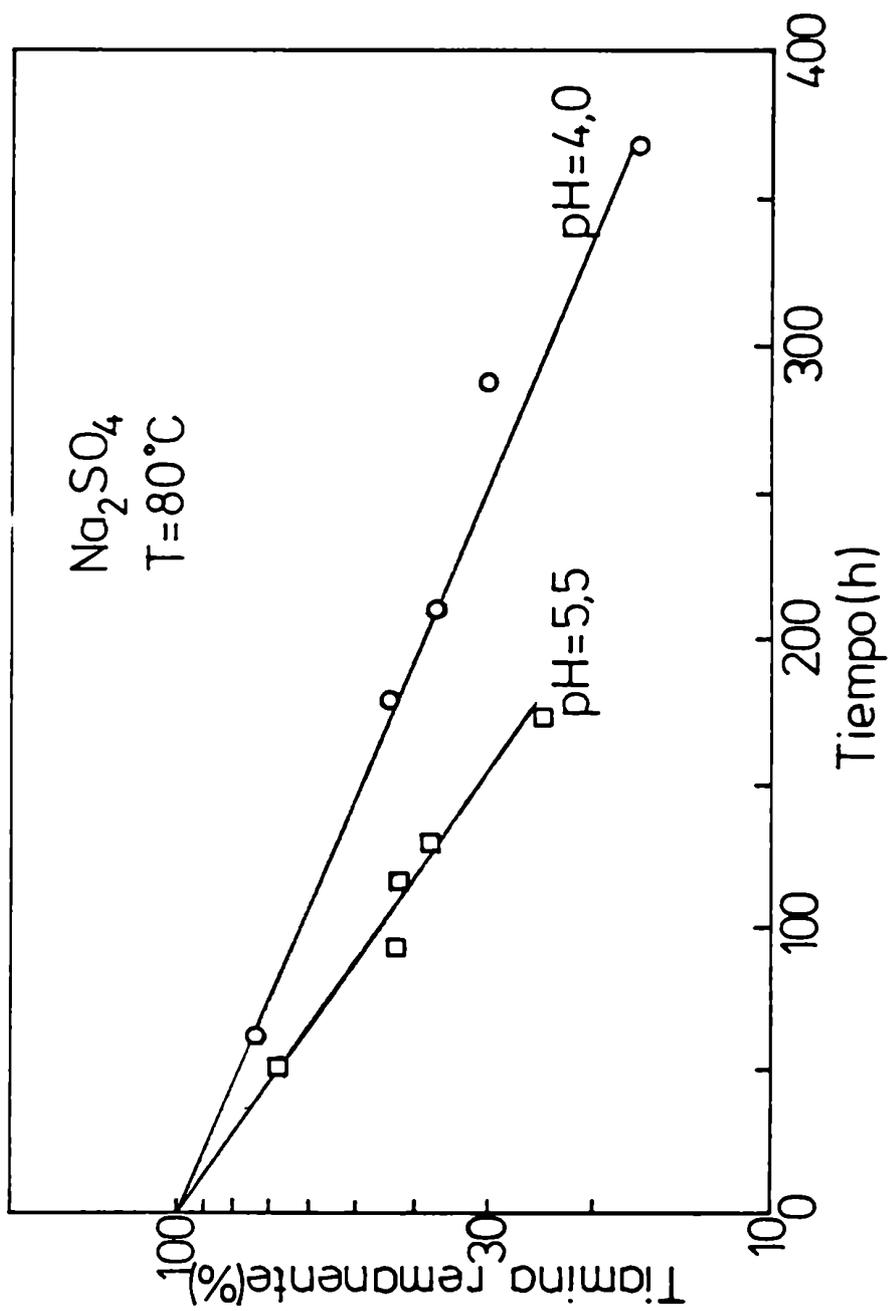


Figura 22

Retención de tiamina para sistemas modelo

de $a_w = 0,950$, ajustada con Na_2SO_4 ,

a pH 4,0 y 5,5



desde el comienzo de los estudios sobre la estabilidad de la misma (Farrer, 1955).

Haciendo una recapitulación sobre los datos obtenidos con anterioridad a este trabajo, así como de otros autores que trabajaron también con sistemas modelo, podemos ver la influencia del pH sobre las constantes de velocidad en las figuras 23 y 24. En la primera se presenta el efecto del pH a temperaturas de almacenamiento acelerado (45°C - 65°C) y en la segunda a temperaturas elevadas (94°C - 109°C). En todos los casos de soluciones buffer de diferentes a_w calentadas a diversas temperaturas, el efecto acelerante de altos valores de pH es más significativo por encima de pH = 6,0. Esta diferencia de comportamiento puede explicarse a través de las consideraciones de Dwivedi y Arnold (1972, 1973). Estos autores, estudiando los productos de degradación de la tiamina en soluciones acuosas, encontraron que a pH superiores o inferiores a aproximadamente 6,0 se producían diferentes rupturas de la molécula. Así, el calentamiento de soluciones de tiamina a pH 6,0 o más bajos producía la ruptura del "puente" metileno entre las moléculas de pirimidina y tiazol de la tiamina, dando lugar a la formación del 4-metil-5-(β -hidroxi-etil) tiazol, como el principal compuesto que contenía azufre, y un derivado de la pirimidina, probablemente la 2-metil-4-amino-

///

Figura 23

Efecto del pH en las constantes de velocidad
de degradación térmica de tiamina a
temperaturas de almacenamiento
acelerado

Referencias:

- buffer fosfato + glicerol, $a_w = 0,90$ (Fernández, 1984)
- buffer fosfato + glicerol, $a_w = 0,95$. (Fernández, 1984)

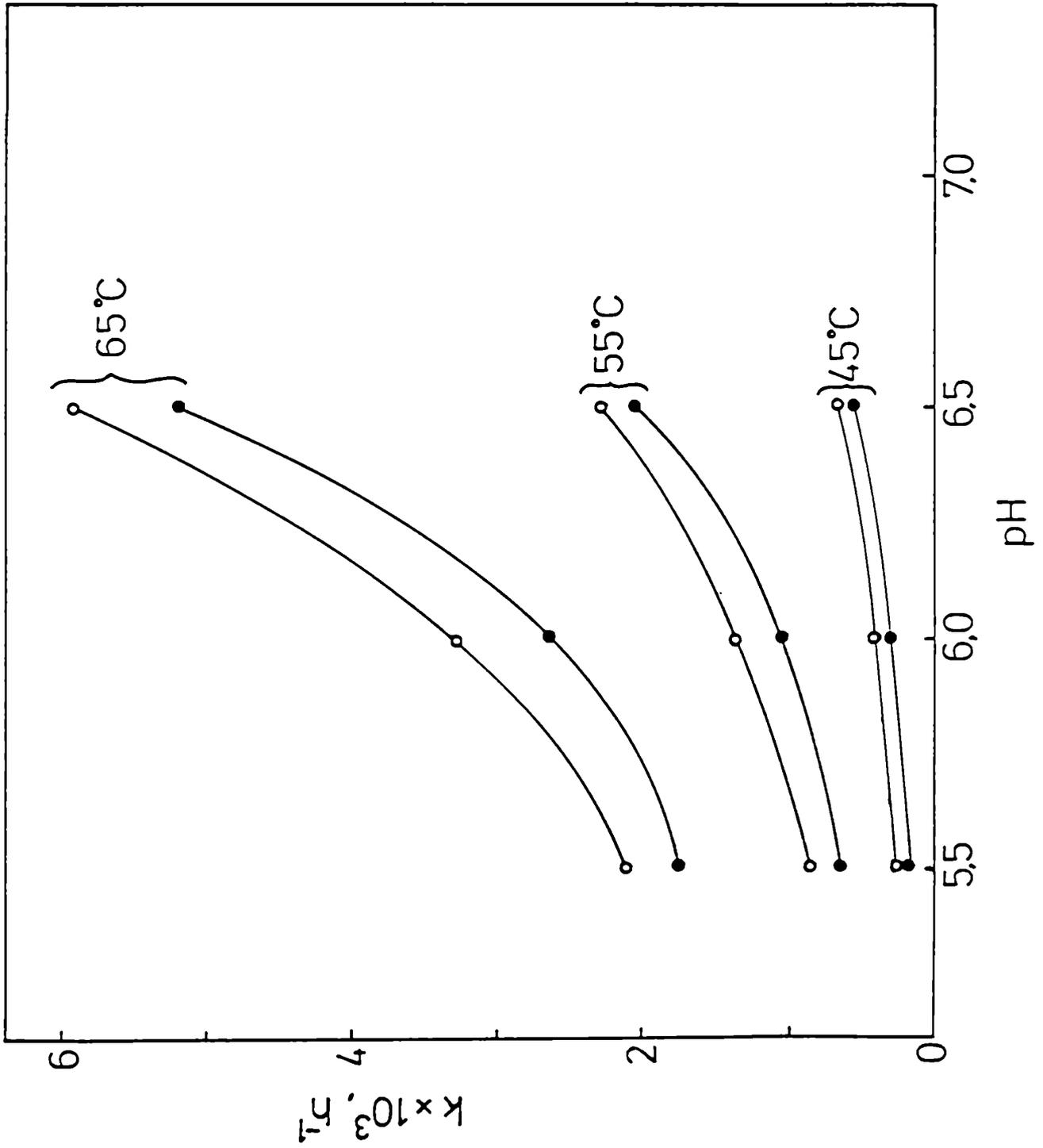
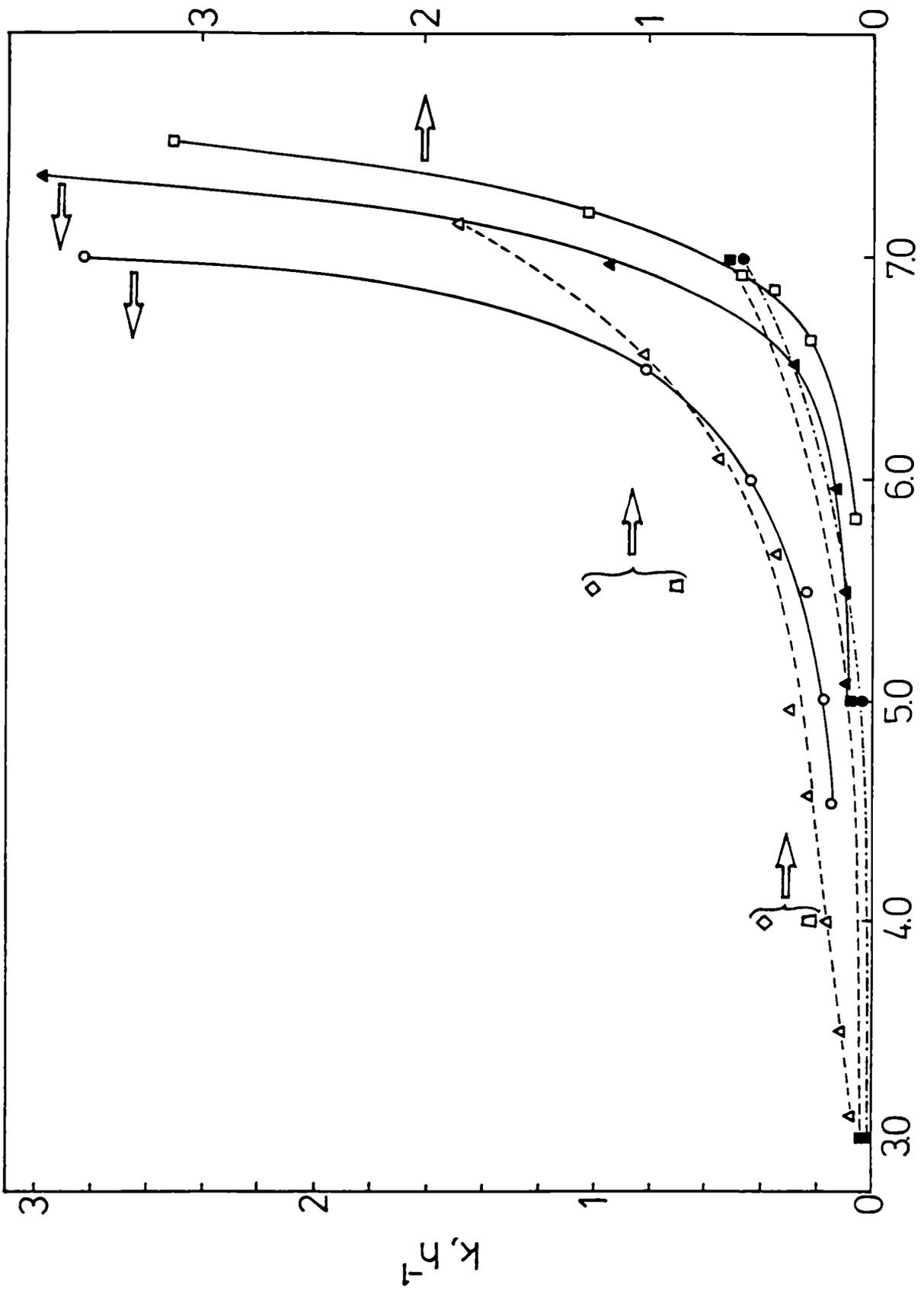


Figura 24

Efecto del pH en las constantes de velocidad
de degradación térmica de tiamina a
temperaturas elevadas

Referencias:

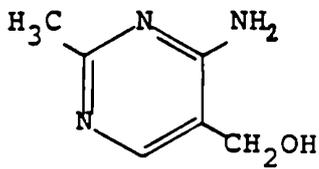
- buffer fosfato, 109°C (Felicciotti y Esselen, 1957)
- ▲ buffer fosfato, 100°C (Farrer, 1945)
- △ buffer fosfato + ácido cítrico, 100°C (Farrer, 1945)
- buffer fosfato, 94°C (Fox y col., 1982)
- buffer fosfato + glicerol, $a_w = 0,90$, 94°C (Fox y col., 1982)
- farina, 100°C (Farrer, 1955)
- ◇ buffer fosfato + propilenglicol, $a_w = 0,95$; 80°C (este trabajo)
- ▣ buffer fosfato + NaCl, $a_w = 0,95$; 80°C (este trabajo)



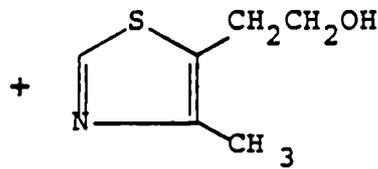
-5-hidroximetil pirimidina, tal como se observa en la figura 25 vía "a". Bajo condiciones neutras o levemente alcalinas, el sulfuro de hidrógeno es probablemente el mayor producto de degradación a partir de la molécula de tiazol de la tiamina, junto con menores cantidades de otros productos azufrados (figura 25, vías "b" y/o "c"). La secuencia de la reacción de formación de estos compuestos volátiles a partir de la tiamina (productos "IV" en la figura 25) no se conocen.

Dwivedi y Arnold (1972) plantearon que las uniones N-C o C-S se rompen tal como está indicado por la línea punteada, seguido por un reordenamiento y ciclación. Por otra parte, también informaron la formación del compuesto "III" por pérdida de sulfuro de hidrógeno al calentar la sal sódica de tiamina en agua. Dwivedi y Arnold concluyeron que las pequeñas cantidades de las formas pseudo base "I" y/o tiol "II" de la tiamina que coexisten con tiamina libre por encima de pH 6,0 son responsables de estos productos de degradación. Ellos sostienen que la energía de activación involucrada en el desprendimiento de sulfuro de hidrógeno de la tiamina a pH 7,0 y 8,0 es menor que la energía de activación para la ruptura del puente metileno de la tiamina. Esto explica la ausencia de 4-metil-5-(β -hidroxietil) tiazol en sus soluciones calentadas de tiamina, y su menor concentración

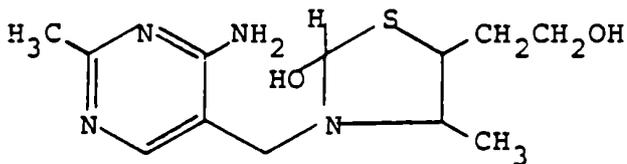
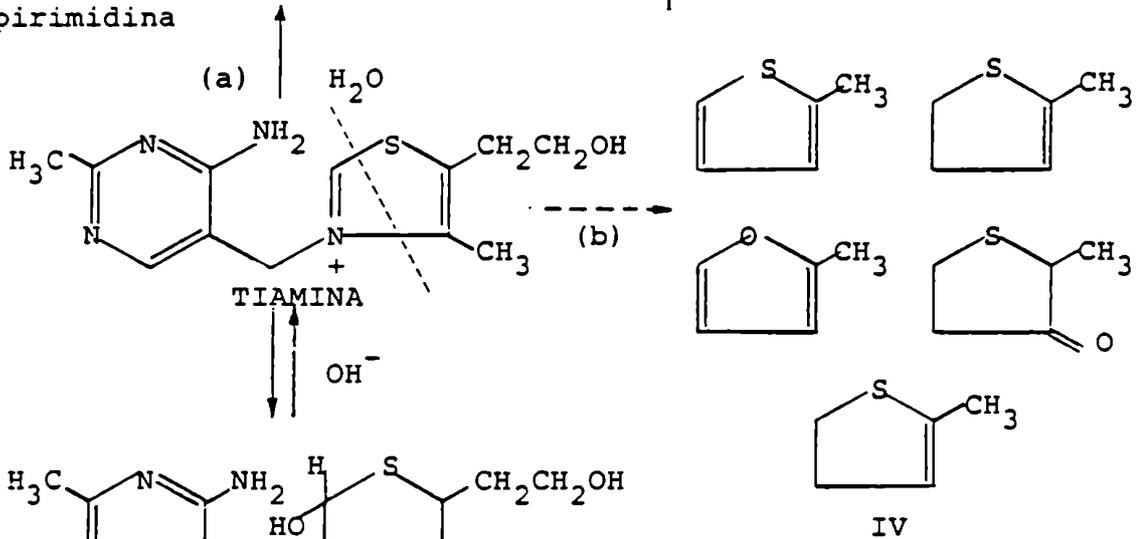
///



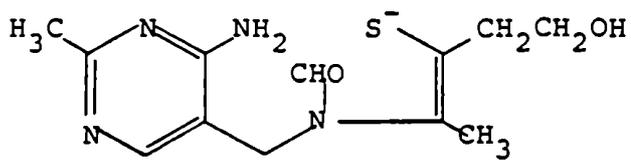
2-metil-4-amino-5-hidroxi-
metil pirimidina



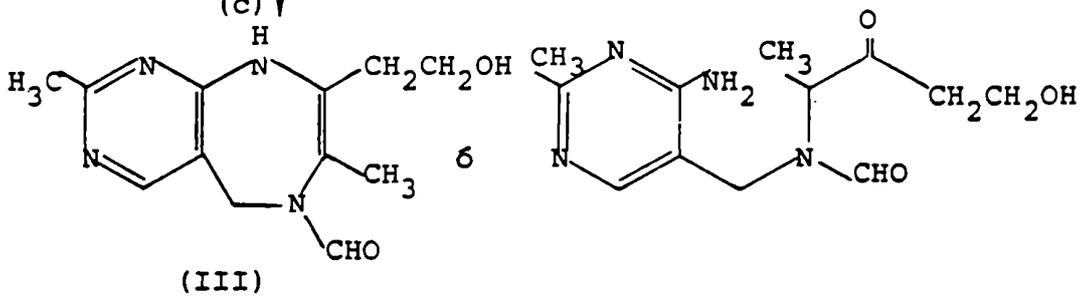
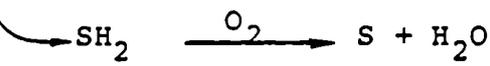
4-metil-5-(β-hidroxi-etil) tiazol



(I)
-H⁺



(II)



Luego la tiamina, en condiciones ácidas estará presente como I' y/o II' dependiendo del pH de la solución.

Dwivedi y Arnold (1972) observaron que a pH 3,5 ocurre menor ruptura de la molécula de tiamina que a pH 5,0 o 6,0, lo cual sugiere que la forma protonada de la tiamina, tiamina I', que predomina a pH 3,5, es menos propensa a la destrucción térmica que la tiamina II'. El modo en que ocurre la destrucción de la vitamina parece ser el mismo para ambas formas, con la formación de los derivados ya mencionados. Todas estas consideraciones esclarecen, en parte, la diversidad de productos obtenidos por degradación térmica de esta vitamina y explican las diferencias de las constantes de velocidad con el pH encontradas en este trabajo así como en los trabajos de diversos autores aquí recopilados.

Hay muy poca información concerniente al efecto del pH sobre la estabilidad de tiamina en alimentos. Farrer (1955) reportó datos sobre la pérdida de tiamina en harina con pH modificado con diversas cantidades de Na_2HPO_4 (figura 24) y el efecto del pH en la velocidad de degradación es similar al encontrado en buffer y sistemas modelo. Bendix y col. (1951) mostraron el efecto acelerante de altos pH sobre la destrucción de tiamina en tomates y porotos usando agentes reguladores de pH para obtener un rango de aproximadamente 2 unidades en las cercanías del pH

///

normal del producto.

Briozzo y col. (1987) trabajaron en el procesamiento térmico de puré de arvejas, choclo, carne de cerdo, carne vacuna e hígado, cuyos valores de pH inicial (comprendidos entre 5,2 y 6,2) fueron reducidos aproximadamente a pH 5,0, de forma tal de no alterar apreciablemente el gusto del alimento. En todos los casos la ligera reducción de pH aumentó significativamente la retención de tiamina después del procesamiento.

Puede concluirse que, a pesar de que la información disponible es limitada, parece que ocurre un comportamiento similar en la cinética de pérdida de esta vitamina por cambios de pH tanto en alimentos como en sistemas modelo.

Estos resultados sugieren, por un lado, que durante el procesamiento térmico de ciertos alimentos de baja acidez pueden obtenerse significativas mejoras en la retención de tiamina mediante una moderada reducción del pH compatible con la aceptabilidad del alimento. Además, y desde el punto de vista de la preservación de alimentos por combinación de factores de stress antimicrobianos, tal como se ha explicado en la introducción, la reducción del pH forma parte de la metodología empleada. Luego, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y con los datos recopilados de literatura, esta disminución del

pH resulta altamente favorable para la conservación de un nutriente esencial, la tiamina, en este nuevo tipo de alimentos.

4.3. Influencia de la composición del sistema

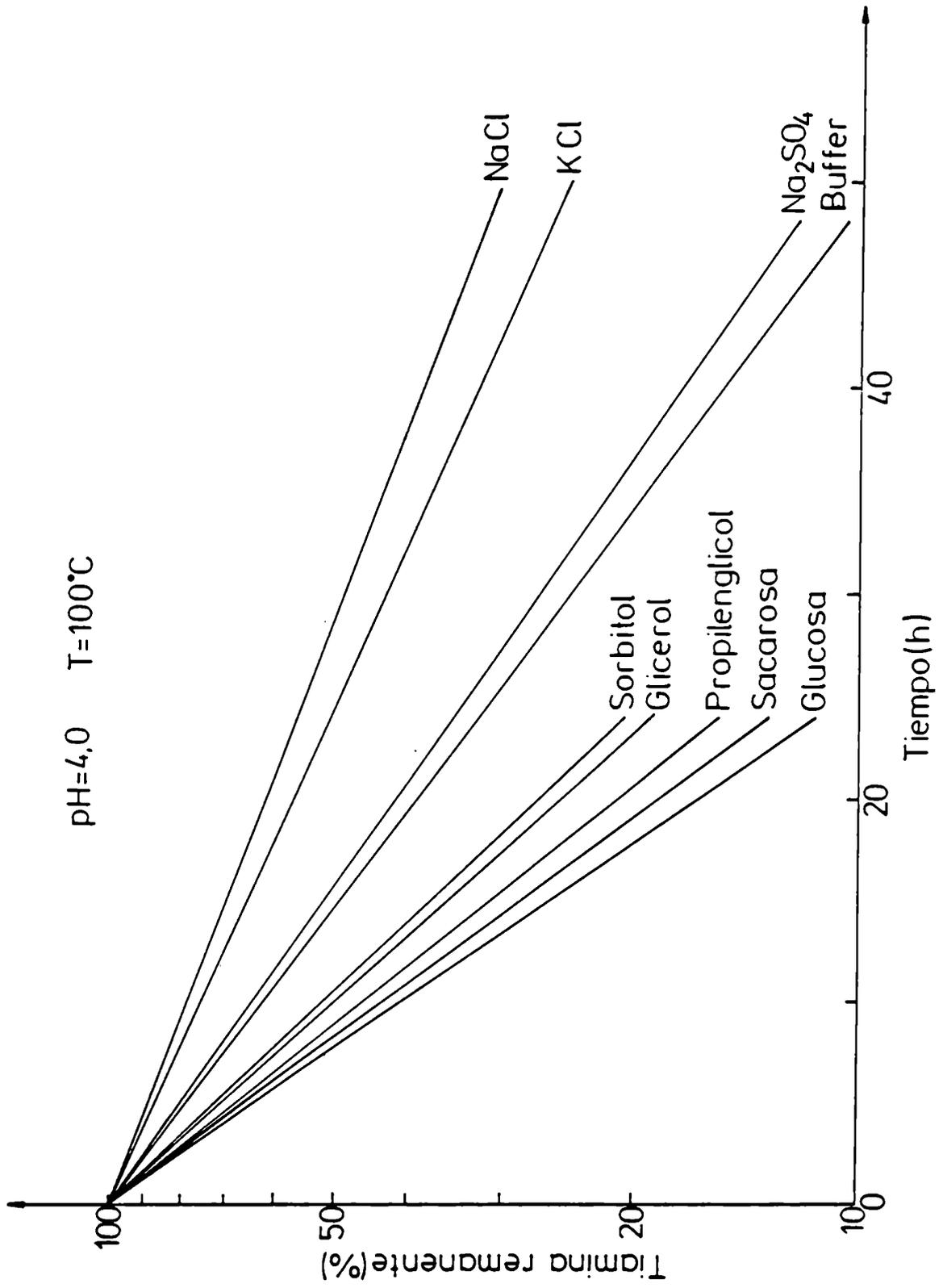
A partir de los resultados reportados en la tabla 4.1, se observa que el humectante utilizado para ajustar la a_w de los sistemas modelo a 0,950 tiene influencia en la velocidad de degradación de la tiamina.

En la figura 26 se representa con fines comparativos la retención de la vitamina en función del tiempo de tratamiento térmico a 100°C y pH 4,0 para todos los sistemas modelo estudiados. Los valores de retención han sido determinados a partir de las constantes de velocidad informadas en la tabla 4.1. Puede verse que en el caso de los sistemas conteniendo no-electrolitos (glicerol, sorbitol, propilenglicol, glucosa y sacarosa) las pérdidas de tiamina son ligeramente mayores que en el sistema modelo de $a_w \approx 1$ (sin humectante). En cambio, con el agregado de electrolitos (NaCl, KCl y Na_2SO_4) se verifica un efecto inverso.

Para tratar de explicar las diferencias observadas en la velocidad de pérdida de esta vitamina en presencia de los distintos humectantes, es conveniente considerar qué tipo de reacción se produce. La típica vía de degradación (figura 25) parece

Figura 26

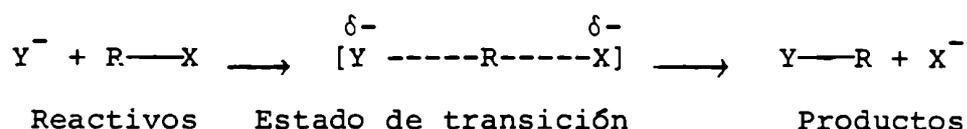
Efecto del humectante en la velocidad de
degradación de tiamina
a 100°C y pH 4,0



involucrar un desplazamiento nucleofílico en el carbono metilénico que une los dos anillos de la molécula (Tannenbaum, 1979).

Las reacciones de sustitución nucleofílica pueden ocurrir a través de dos mecanismos diferentes: S_N1 y S_N2 (Morrison y Boyd, 1966).

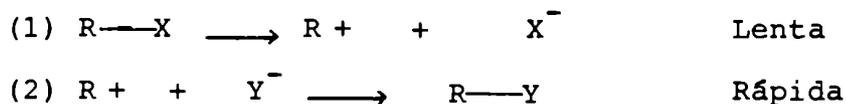
Una reacción S_N2 puede esquematizarse:



donde Y^- es el reactivo nucleofílico. En la misma el estado de transición puede visualizarse como una estructura en la cual el átomo de C está parcialmente unido tanto a $-Y$ como a $-X$; la unión C-Y no se ha formado completamente y la unión C-X todavía no se ha roto. Al mismo tiempo, por supuesto, las uniones ión-dipolo entre el nucleófilo Y^- y el solvente se están rompiendo y uniones ión-dipolo entre el ión X^- y el solvente se están formando. El $-Y$ y el $-X$ están localizados lo más lejos posible entre sí. Este es el mecanismo llamado "sustitución nucleofílica bimolecular", en la que el término bimolecular indica que el paso limitante involucra la colisión de dos partículas. En general, una reacción S_N2 sigue una cinética de segundo orden y se produce con una inversión

completa de configuración.

Una reacción S_N1 ocurre a través del siguiente mecanismo:



La velocidad de la reacción global está determinada por la ruptura lenta de la unión R-X. Este paso limitante es un proceso que demanda energía, la cual es aportada por la formación de muchas uniones ión-dipolo entre las dos clases de iones y el solvente. Este mecanismo se llama "sustitución nucleofílica unimolecular" pues el paso limitante involucra sólo una molécula. En general una reacción S_N1 sigue una cinética de primer orden.

Las sustituciones nucleofílicas que siguen una cinética de primer orden muestran racemización y reacomodamiento y la secuencia de reactividad: $3^\circ > 2^\circ > 1^\circ > \text{CH}_3\text{X}$. Las reacciones que siguen cinética de segundo orden muestran una inversión estereoquímica completa y ningún reacomodamiento y siguen la secuencia: $\text{CH}_3\text{X} > 1^\circ > 2^\circ > 3^\circ$.

Debido a que hay dos secuencias de reacción opuestas, raramente se encuentra alguno de los dos mecanismos en forma pura, sino una combinación de los dos. La reacción de ruptura de la tiamina involucra un carbono secundario, luego es factible pensar

///

que ocurre a través de una mezcla de ambos mecanismos.

El cambio en las condiciones experimentales afecta la importancia relativa de los dos mecanismos. Una alta concentración del reactivo nucleofílico favorece la reacción S_N2 . La naturaleza del reactivo nucleofílico también juega un papel importante. Finalmente, la polaridad del solvente puede determinar el mecanismo a través del cual ocurre la reacción. Cuanto más polar es el solvente, más fuertes serán las fuerzas de solvatación y más rápida la ionización. En la reacción S_N1 el estado de transición es más polar que el reactivo y se estabiliza más por solvatación. En la reacción S_N2 la carga negativa está dispersa sobre el -Y y el -X, luego este estado de transición está menos solvatado que los reactivos. Estos tienen cargas concentradas y se estabilizan más que el estado de transición por solvatación.

Un cambio en las propiedades del solvente puede afectar considerablemente la velocidad e incluso el orden de las reacciones químicas homogéneas (Reichardt, 1979).

La tabla 3.1 permite visualizar las cantidades relativas de soluto, tiamina y agua en los distintos sistemas modelo utilizados. Las cantidades agregadas de humectantes son los suficientemente elevadas como para provocar modificaciones en las propiedades del agua.

Los efectos del solvente en las reacciones químicas orgánicas han sido ampliamente estudiados. Usualmente los químicos orgánicos tratan de interpretar estos efectos en términos de la "polaridad" del solvente, definiendo a la misma como la capacidad de éste para solvatar las especies dipolares o cargadas disueltas. Si bien las teorías ideales han propuesto como medida cuantitativa de la polaridad del solvente a la constante dieléctrica, ϵ , del mismo, esta hipótesis no es siempre adecuada. Estas teorías consideran al solvente como un medio continuo, no compuesto por moléculas individuales, y no toman en cuenta las interacciones específicas entre el solvente y el soluto, a saber: interacciones coulombicas entre iones, interacciones direccionales entre dipolos, unión hidrógeno, uniones inductivas y de dispersión, transferencia de carga e interacciones solvofóbicas. Así, ningún parámetro físico macroscópico puede tener en cuenta la gran cantidad de interacciones soluto-solvente a nivel microscópico molecular. La complejidad de las interacciones mencionadas no ha permitido encontrar expresiones matemáticas de aplicación general que permitan predecir las velocidades de reacción en distintos solventes. Se han buscado, entonces, otros índices de polaridad del solvente y se han introducido escalas empíricas basadas en procesos de referencia, bien conocidos y muy sensibles

///

al solvente. Dimroth y colaboradores (Reichardt, 1979) han propuesto el parámetro de polaridad del solvente E_T (30), que puede definirse como la energía de transición del colorante 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-piridinio)fenóxido (colorante N° 30 en Dimroth y col., 1963) en la banda de absorción solvatocrómica de mayor longitud de onda, medida en kcal/mol. Debido al gran desplazamiento de la banda de absorción solvatocrómica que puede obtenerse a partir de este colorante, los valores de E_T (30) proveen una caracterización excelente y muy sensible de la polaridad de los solventes. A mayor valor de E_T (30), más alta es la polaridad del solvente.

En la tabla 4.8 se reportan los valores de E_T (30) para algunos solventes puros utilizados en la formulación de los sistemas modelo estudiados. Como no existen datos del valor de este parámetro para todos los medios de reacción analizados, en la tabla 4.9 se representan los valores de la constante dieléctrica, ϵ , de algunos de ellos, si bien, como antes se mencionó, no es una buena medida de la polaridad del solvente.

De acuerdo a los valores de E_T (30) presentados en la tabla 4.8, tanto el agua como el glicerol y el propilenglicol pertenecen al grupo de solventes "próticos" (cuyos valores de E_T (30) están comprendidos entre 47 y 63 kcal/mol). El solvente

///

Tabla 4.8 Parámetro empírico de polaridad del solvente, $E_T(30)$,
medido a 25°C y 1 atm (Reichardt, 1979)

Solvente	$E_T(30)$ (kcal/mol)
Agua	63,1
Glicerol	57,0
Propilenglicol	54,1

Tabla 4.9 Constante dieléctrica, ϵ , del agua y de soluciones de $a_w \cong 0,950$

Sistema	ϵ
Agua	78,3 (25°C) ^a
	60,6 (80°C) ^c
Solución de NaCl	63,0 (25°C) ^b
Solución de KCl	63,9 (25°C) ^b
Solución de Na ₂ SO ₄	47,5 (25°C) ^b
Solución de glicerol	56,0 (80°C) ^c
Solución de sacarosa	50,5 (80°C) ^c

(a) Robinson y Stokes, 1968

(b) Evaluado a partir de la ecuación $\epsilon = \epsilon_w + 2\bar{\delta}c$, siendo ϵ_w la constante dieléctrica del agua; $\bar{\delta}$ la depresión molar de ϵ_w por los electrolitos y c la concentración molar (Robinson y Stokes, 1968).

(c) Akerlöf, 1932.

más "polar" de acuerdo a la escala E_T (30) es el agua (E_T (30) = 63 kcal/mol). En cambio, los solventes "apróticos dipolares" presentan E_T (30) en el rango 40-47 y los solventes "apróticos apolares" en el rango 30-40.

Si bien los valores de E_T (30) de mezclas binarias de solventes no están relacionados a su composición de una manera simple, puede suponerse que para las soluciones de glicerol y propilenglicol empleadas en este estudio, los valores de E_T (30) estarán comprendidos entre los correspondientes a los solventes puros, ya que son solventes de propiedades similares (Reichardt, 1979). Por lo tanto los valores de E_T (30) de dichas soluciones serán ligeramente menores al del agua pura, indicando esto una leve disminución de su polaridad.

Por otra parte, si bien no hay datos de constantes dieléctricas para todas las soluciones de estudio, los valores de ϵ reportados en la tabla 4.9 para sistemas de a_w 0,950 conteniendo glicerol o sacarosa muestran también una leve disminución de este parámetro respecto del agua pura. La tabla 4.9 también muestra los valores calculados de ϵ para las soluciones de los electrolitos de a_w 0,950, siendo similares las de NaCl y KCl y un poco menor el valor de ϵ para el Na_2SO_4 .

En general, el cambio a un solvente más polar aumentará

///

o disminuirá la velocidad de reacción de sustitución nucleofílica dependiendo de si el complejo activado de la reacción es más o menos polar que los reactivos iniciales. Asociando el término "polaridad del solvente" con el poder de solvatar cargas (de reactivos o del complejo activado), la teoría de Hughes e Ingold predice para las reacciones S_N1 y S_N2 y distintos estados de carga de los reactivos iniciales, los efectos del solvente en la velocidad de reacción. Considerando los casos en los que podría incluirse la degradación de tiamina, estos efectos se muestran en la tabla 4.10 (Reichardt, 1979). Cualquiera sea el tipo de mecanismo (S_N1 o S_N2), teniendo en cuenta que la molécula de tiamina está cargada positivamente, el aumento de la polaridad del solvente se traduce en todos los casos en una disminución de la velocidad de reacción.

Si se analizan las constantes de reacción para el sistema sin humectante (agua + fosfato) y los sistemas que contienen no-electrolitos (tabla 4.1), se observan mayores valores de velocidad de reacción en estas últimas a los dos pH estudiados. Este aumento, en el caso de los sistemas con glicerol, propilenglicol y sorbitol, es pequeño pero para los sistemas con azúcares es más significativo. Como ya se ha mostrado en la tabla 4.8 la presencia de no electrolitos (glicerol y propilenglicol) en los sistemas

Tabla 4.10 Predicción del efecto de la polaridad del solvente en las reacciones de sustitución nucleofílica

Tipo de reacción	Reactivos iniciales	Complejo activado	Alteración de la carga durante la activación	Efecto del aumento de la polaridad del solvente en la velocidad de reacción
S_N1	$R-X^+$	$R^{\delta+} \dots X^{\delta+}$	Dispersión de carga	Disminución pequeña
S_N2	$Y + R-X^+$	$Y^{\delta+} \dots R \dots X^{\delta+}$	Dispersión de carga	Disminución pequeña
S_N2	$Y^- + R-X^+$	$Y^{\delta-} \dots R \dots X^{\delta+}$	Destrucción de carga	Disminución grande

modelo de a_w 0,950 disminuye levemente la polaridad del solvente. De acuerdo a Hughes e Ingold, esta disminución en la polaridad explica el pequeño aumento en la velocidad de degradación de tiamina. Para los sistemas conteniendo sorbitol, no hay datos en la literatura que permitan evaluar su polaridad, pero dada su naturaleza similar, la misma no debe ser muy diferente de la de los otros dos polioles estudiados. Por lo tanto, puede justificarse de igual forma la diferencia entre los valores de constantes de velocidad para estos sistemas y el buffer.

Las mayores constantes de velocidad para los sistemas con azúcares podrían explicarse a través de la consideración de dos factores: Por un lado, si bien no se han encontrado valores de E_T (30) para estas soluciones, el dato de ϵ reportado en la tabla 4.9 indicaría que la polaridad de estas soluciones serían ligeramente menores que la de los demás no-electrolitos. Por otra parte, los sistemas con glucosa y sacarosa experimentaron durante el tratamiento térmico desarrollo apreciable de color, lo que indica que ocurrieron reacciones de pardeamiento no enzimático. Estas podrían involucrar tanto la descomposición de los azúcares provocado por el calentamiento (sin participación de grupos amino) o "caramelización", como la reacción en la que los grupos carbonilo de la forma acíclica de los azúcares reductores (glucosa o

///

sacarosa hidrolizada) se condensa con grupos amino básicos, en este caso de la tiamina, si es que esta vitamina participa de la reacción de Maillard (Mauron, 1981; Labuza y col., 1970). Esta última posibilidad ha sido planteada por diversos autores (Lange y col., 1954; Lhoest y col., 1958) y justificaría los valores mayores de velocidad observados. Sin embargo, el rol de la tiamina en la reacción de Maillard no puede inferirse de las investigaciones hechas en este trabajo y necesitaría ser estudiada específicamente. Además, debe tenerse en cuenta que estas constantes de velocidad han sido determinadas empleando el método microbiológico de determinación de tiamina y sus errores son apreciables (tal como se refleja en la tabla 4.1), lo que no permite sacar demasiadas conclusiones en base a sus valores.

Otro fenómeno a tener en cuenta en el análisis del efecto de los no electrolitos es que la disociación ácido/base y el potencial de óxido-reducción del agua varían con la presencia de un co-solvente y es probable que esta modificación sea, al menos parcialmente, responsable del efecto del medio en la velocidad de reacción (Franks, 1983). En particular, la constante de disociación del agua se incrementa en presencia de aditivos orgánicos. Este hecho aumentará, por ejemplo, la concentración del nucleófilo (considerando que la base desplazante es el HO^-) aumentando la

///

velocidad de reacción respecto de la velocidad en agua pura.

En los sistemas cuya a_w se ajustó con el agregado de electrolitos, las velocidades de reacción son menores que para el sistema sin humectante. Sin embargo, los valores de ϵ reportados en la tabla 4.9 para estos sistemas son menores que para el agua. Al respecto, debe tenerse en cuenta que la teoría de Hughes-Ingold tiene la limitación de no considerar los cambios en la estructura del solvente, justamente modificado por la presencia de sales.

Para tratar de interpretar estos resultados se analizará el efecto de la presencia de electrolitos en el medio de reacción.

Ya que los iones simples tienen dimensiones y cargas comparables a los de la molécula de agua, es de esperar que la estructura del agua se modifique considerablemente en soluciones iónicas (Robinson y Stokes, 1968). A bajas concentraciones las propiedades de transporte del agua pueden ser explicadas adecuadamente teniendo en cuenta sólo la magnitud de la carga iónica, la concentración y la constante dieléctrica del solvente (ley de Debye-Hückel). Los efectos de los electrolitos en ciertos procesos no son específicos hasta concentraciones de aproximadamente 0,1 molar y pueden expresarse en términos de la fuerza iónica. A altas concentraciones (como es el caso de este estudio) los efectos

///

específicos ión-solvente dominan la conducta de la solución y la misma no puede explicarse a través de consideraciones puramente electrostáticas.

Como resultado de las interacciones ión-dipolo, las moléculas de solvente se reorganizan en la esfera de solvatación iónica. En este aspecto es importante recordar que existen dos tipos de iones: los destructores de estructura ("structure-breaker ions") y los promotores de estructura ("structure-maker ions") (Franks, 1983). El grado de ordenamiento de las moléculas de agua en la vecindad de un ión depende en primera instancia de la densidad de carga superficial de éste. Esto está determinado por la carga y el radio iónico: iones chicos y/o altamente cargados tendrán esferas de hidratación bien ordenadas, mientras que iones grandes, con cargas simples, no podrán alinear los dipolos del agua y sobrepasar hasta un cierto grado las interacciones por puente de hidrógeno que existen en el seno de la misma. Tales iones se clasifican como destructores de estructura, y los del primer tipo como promotores de estructura. Los iones Cl^- , Na^+ y K^+ son destructores de estructura, mientras que existe evidencia experimental de que los iones $\text{SO}_4^{=}$ actúan como promotores de estructura.

Esta diferencia de comportamiento entre los distintos iones justificaría los resultados encontrados en los sistemas que

///

contienen electrolitos a pH 4,0. No solamente se observa que estos presentan menores velocidades de degradación que en el sistema sin humectante, sino que existen diferencias apreciables entre el sistema con Na_2SO_4 como soluto y los sistemas con NaCl o KCl. A igualdad de tratamiento térmico las pérdidas de tiamina son mucho menores en estos últimos.

La comparación de los coeficientes de actividad del NaCl y KCl con el del Na_2SO_4 es otra manera de indicar la diferencia de la interacción ión-agua. A continuación se muestran los valores de coeficientes de actividad para los electrolitos estudiados, en soluciones acuosas de a_w 0,950 (Robinson y Stokes, 1968):

Soluto	Coeficiente de actividad $a_{a_w} = 0,950$
NaCl	0,655
KCl	0,586
Na_2SO_4	0,164

Puede observarse que es notable la diferencia entre los coeficientes de los cloruros (similares entre sí) y el correspondiente al Na_2SO_4 .

Los coeficientes de actividad del soluto están afectados tanto por las fuerzas interiónicas de largo alcance, como por las interacciones de corto alcance entre los iones y las moléculas de solvente, siendo éstas más importantes en soluciones concentradas. Cuanto mayor es el grado de hidratación del ión, mayor es el coeficiente de actividad.

Luego los valores de NaCl y KCl son altos y parecidos entre sí y la pequeña diferencia se debe a que el coeficiente de actividad del Na^+ es mayor que el de K^+ (Robinson y Stokes, 1968). En cambio el coeficiente de actividad del Na_2SO_4 es mucho menor pues aniones polivalentes grandes presentan menor grado de hidratación.

De estas consideraciones puede concluirse que, dada la diferente afinidad que tienen las sales estudiadas por el agua así como la forma en que éstas perturban la estructura de la misma, las constantes de velocidad de la reacción en sistemas con Na_2SO_4 sean distintas a las halladas en los sistemas con NaCl y KCl.

A pH 5,5 sin embargo, si bien la presencia de las sales consideradas tiene un efecto protector respecto del sistema sin humectante, no hay diferencias significativas entre las constantes de velocidad de la reacción para los diferentes electrolitos.

///

La influencia de los distintos humectantes en la cinética de degradación de tiamina puede visualizarse mejor a través del tiempo de vida media ($\theta_{1/2}$), que para una reacción de primer orden resulta:

$$\theta_{1/2} = 0,693/k \quad (4.10)$$

En las tablas 4.11 y 4.12 se muestran los valores de $\theta_{1/2}$ para los distintos sistemas estudiados en este trabajo, a 80°C, 90°C y 100°C. Se reporta también, a continuación del promedio calculado, el rango de variación del mismo, evaluado a partir del error en el cálculo de las constantes de velocidad (4.1).

Resulta de interés comparar los resultados de este trabajo con los datos cinéticos encontrados en la literatura sobre la pérdida de tiamina en diferentes sistemas y alimentos. Con este propósito, la tabla 4.13 muestra los $\theta_{1/2}$ de la degradación de tiamina a 100°C para soluciones buffers ($a_w \cong 0,99$; pH 6,0), sistemas modelo ($a_w = 0,950$; pH 6,0) y alimentos: carnes, vegetales y leche a su pH natural ($\cong 6$). El tipo y concentración de la sal del buffer en los sistemas modelo tiene una gran influencia sobre la estabilidad de la tiamina, produciendo un cambio en los

///

Tabla 4.11 Tiempo de vida media para la degradación de tiamina
en los sistemas modelo de a_w 0,950 y en el sistema
de $a_w \cong 1$ a pH 4,0

Humectante	Tiempo de vida media (h)		
	100°C	90°C	80°C
Glucosa	8(6-10)	16(14-18)	49(46-53)
Sacarosa	8(7-9)	26(21-33)	49(43-58)
Sorbitol	9(8-10)	28(27-28)	92(83-103)
Glicerol	10(10-10)	30(29-30)	80(76-83)
Propilenglicol	10(10-11)	28(27-29)	82(80-83)
Buffer ($a_w \cong 1$)	15(14-15)	38(33-46)	107(99-115)
Na ₂ SO ₄	16(14-18)	41(39-43)	133(128-139)
KCl	25(24-26)	71(67-74)	231(223-239)
NaCl	29(28-30)	65(63-67)	223(217-231)

Tabla 4.12 Tiempo de vida media para la degradación de tiamina en los sistemas modelo de a_w 0,950 y en el sistema de $a_w \cong 1$ a pH 5,5

Humectante	Tiempo de vida media (h)		
	100°C	90°C	80°C
Glucosa	5 (5-6)	9 (8-10)	41 (36-46)
Sacarosa	4 (3-4)	14 (12-16)	35 (30-41)
Sorbitol	6 (5-6)	12 (11-12)	33 (30-36)
Glicerol	7 (6-7)	15 (14-16)	41 (36-46)
Propilenglicol	7 (7-7)	19 (18-20)	46 (43-49)
Buffer ($a_w \cong 1$)	7 (7-8)	20 (18-22)	49 (46-53)
Na ₂ SO ₄	10 (9-11)	26 (26-27)	86 (81-90)
KCl	10 (10-11)	31 (30-33)	87 (79-96)
NaCl	11 (10-11)	26 (23-29)	80 (75-84)

valores de $\theta_{1/2}$ a través de un factor de hasta 8 aún considerando que la a_w y el pH fueron los mismos. De todos modos, la estabilidad de la tiamina en los alimentos parece estar menos influenciada por el tipo de alimento considerado, ya que los valores de $\theta_{1/2}$ son similares. En carne (vaca, cerdo, cordero), vegetales (espinaca, zanahoria, arveja) o leche se encontró una variación máxima de 1,5 veces. Una excepción a esto son los altos valores reportados por Mulley y col., (1975a) que usaron alimentos fortificados con tiamina. Este hecho puede explicar las diferencias observadas, ya que se ha demostrado que la estabilidad de las vitaminas agregadas para fortificar el alimento es diferente a la de las vitaminas nativas (Thompson, 1982).

Si bien el pH de los sistemas considerados en la tabla 4.13 es ligeramente diferente del pH más alto de este estudio (5,5), los $\theta_{1/2}$ de la tabla 4.12 son similares a los de otros sistemas modelo de a_w reducida y son iguales o mayores que los encontrados en alimentos. De acuerdo a estos resultados, podría esperarse una mayor retención de tiamina en alimentos de alta humedad preservados, por ejemplo, por reducción de la a_w , control del pH y un tratamiento de pasteurización, que en alimentos esterilizados. Sin embargo, esta suposición debe ser confirmada a través de la evaluación de las pérdidas de tiamina en alimentos reales, conservados por esta combinación de factores.

///

Tabla 4.13 Tiempos de vida media a 100°C de la degradación de tiamina en sistemas modelo y alimentos

Sistema	$t_{1/2}$ (h)	Referencia
<u>Soluciones buffer y sistemas modelo</u>		
(pH = 6,0)		
Acido cítrico 0,1M+Na ₂ HPO ₄ 0,2M	1	Farrer (1945)
Acido cítrico 0,02M+Na ₂ HPO ₄ 0,1M	2	Farrer (1945)
Ftalato ácido de potasio 0,1M + KH ₂ PO ₄	2	Farrer (1947)
Ftalato ácido de potasio 0,2M	3	Booth(1943)
Na ₂ HPO ₄ 0,1M+ tartrato de Na ⁺ y K ⁺ 0,02M	4	Farrer (1947)
K ₂ HPO ₄ 0,2M	4	Booth(1943)
NaH ₂ PO ₄ M/15+Na ₂ HPO ₄ M/15	5	Farrer (1945)
Buffer fosfato 0,1M	6	Feliciotti y Esselen (1957)
	6	Mulley y col. (1975,b)

Continuación tabla 4.13

Sistema	$\theta_{1/2}$ (h)	Referencia
Buffer fosfato+glicerol ($a_w = 0,950$)	7	Fox y col. (1982)
Buffer fosfato+glicerol ($a_w = 0,950$)	8**	Fernández (1984)
Diborato de sodio 0,05M + +ácido succínico 0,05M	8	Farrer (1945)
Buffer fosfato+Na ₂ SO ₄ ($a_w = 0,950$)	14**	Fernández (1984)
<u>Alimentos*</u>		
Carne vacuna picada	4	Skjöldebrand y col. (1983)
Puré de corazón vacuno	4	Feliciotti y Esselen (1957)
Puré de espinaca	4	Feliciotti y Esselen (1957)
Puré de hígado vacuno	4	Feliciotti y Esselen (1957)
Puré de carne de cordero	4	Feliciotti y Esselen (1957)
Puré de carne de cordero	4	Feliciotti y Esselen (1957)
Leche entera	5	Bayoumi y Reuter (1980)
Puré de carne de cerdo	5	Feliciotti y Esselen (1957)

Continuación tabla 4.13

Sistema	$\theta_{1/2}$ (h)	Referencia
Puré de arvejas	6	Feliciotti y Esselen (1957)
Puré de zanahorias	6	Feliciotti y Esselen (1957)
Puré de porotos verdes	6	Feliciotti y Esselen (1957)
Puré de arvejas en salmuera	8	Mulley y col. (1975,a)
Puré de arvejas	9	Mulley y col. (1975,a)
Puré de carne vacuna	9	Mulley y col. (1975,a)

* Los valores de a_w se estimaron y están en el rango 0,98 - 0,99 (Chirife y Ferro Fontán, 1982).

** Datos extrapolados a partir del valor de E_a reportado por los autores.

5- CONCLUSIONES

1- La degradación térmica de la tiamina en sistemas modelo de a_w 0,950, ajustada con distintos humectantes (NaCl, KCl, Na_2SO_4 , glicerol, sorbitol, propilenglicol, glucosa o sacarosa) así como en el sistema modelo sin humectante ($a_w \cong 1$), puede describirse a través de una cinética de primer orden.

2- La dependencia de las constantes de velocidad de reacción con la temperatura de tratamiento se puede expresar a través de la ecuación de Arrhenius. Este comportamiento es válido para los sistemas modelo con diferentes solutos tratados en el rango 80°C-100°C, tanto como para otros sistemas reportados en la literatura (incluyendo alimentos) y para rangos de temperatura más amplios que el mencionado. Para la diversidad de sistemas y condiciones estudiados en este trabajo o recopilados de la literatura los valores de E_a observados varían en el estrecho rango 21 - 32 kcal/mol. Estos valores indican la importancia considerable del control de la temperatura para reducir las pérdidas de tiamina.

3- Se verifica en todos los sistemas modelo la gran influencia del pH en la velocidad de destrucción de la tiamina.

///

Independientemente del soluto utilizado en ajustar la a_w , de la temperatura, de la composición del sistema (modelo o alimento) y del tipo de buffer utilizado, se verifica que la disminución del pH constituye un parámetro de singular importancia a los efectos de reducir la velocidad de destrucción de la tiamina.

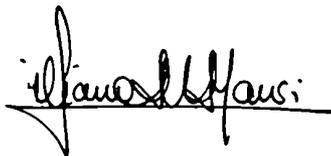
4- Se encuentra que el agregado de no-electrolitos tales como polioles o azúcares facilita la destrucción de tiamina respecto de la que se observa en un sistema buffer (sin agregado de solutos). En cambio el ajuste de la a_w con electrolitos, particularmente NaCl o KCl, ejerce un efecto protector sobre la tiamina.

5- La capacidad de promover o disminuir la velocidad de destrucción de tiamina evidenciada por los diferentes solutos se atribuye a diversos factores que pueden actuar en forma independiente o simultánea. Entre ellos: polaridad del solvente, alteración de la estructura del agua por interacción iónica y cambios en el equilibrio ácido-base.

6- Los resultados expuestos en el presente trabajo son de utilidad a fin de predecir el comportamiento de la tiamina durante el tratamiento térmico de diversos sistemas, en función

///

de la variación de parámetros tales como la temperatura, el pH y el agregado de soluto/s.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Stella M. Alzamora". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath.A handwritten signature in black ink, appearing to read "Stella M. Alzamora". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Dra. STELLA M. ALZAMORA

6. REFERENCIAS

- Acker, L.W. 1969. Water activity and enzyme activity.
Food Technol. 23, 1257.
- Akerlöf, G. 1932. Dielectric constants of some organic solvent-
-water mixtures at various temperatures. J. Am. Chem.
Soc. 54: 4125.
- Alzamora, S.M.; Hough, G. y Chirife, J. 1985. Mathematical
prediction of leaching losses of water soluble
vitamins during blanching of peas. J. Food Technol.
20: 251.
- Anagnostopoulos, G.D. y Dhavises, G. 1982. Chemostat adaptation
of Escherichia coli B/r/1 to low water activity.
J. Appl. Bacteriol. 53: 173.
- A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis of the Association
of Official Analytical Chemists. William Horwitz,
Editor. Washington.
- Arabshahi, A. y Lund, D.B. 1988. Thiamin stability in simulated
moisture food. J. Food Sci. 53: 199.

- Archer, M.C.; Tannenbaum, S.R.; Fan, T.Y. y Weisman, M. 1975.
J. Natl. Cancer Inst. 54: 1203.
- Aykroyd, W.R. y Doughty, J. 1970. Wheat in Human Nutrition.
Food and Agriculture Organization of the U.N., Roma.
- Bayoumi, E.S. y Reuter, H. 1980. Vitamin B₁ - Abban während
der UHT - Erhitzung von Vollmilch. Milchwissenschaft
35: 278.
- Beadle, B.W.; Greenwood, D.A. y Kraybill, H.R. 1943. J. Biol.
Chem. 149: 339.
- Beaton, G.H. y Bengoa, J.M. 1976. "Nutrition in Preventive
Medicine". World Health Organization. Ginebra.
- Bendix, G.H.; Heberlein, D.G.; Ptak, L.R. y Chifcorn, L.E. 1951.
Factors influencing the stability of thiamine during
heat sterilization. Food Res. 16: 494.
- Benmergui, E.A.; Ferro Fontán, C. y Chirife, J. 1979. The
prediction of water activity of aqueous solutions
in connection with intermediate moisture foods:
1. a_w prediction in single aqueous strong electrolyte
solutions. J. Food Technol. 14: 625.

///

- Booth, R.G. 1943. The thermal decomposition of aneurin and co-carboxylase at varying hydrogen ion concentrations. Biochem. J. 37: 518.
- Boquet, R. 1984. Errores estadísticos (Copywrigths N° 1340459).
- Briozzo, J.; Basualdo, R.N.; Carrera, P.A.; Alzamora, S.M. y Chirife, J. 1987. Improvement of thiamine retention in canned low-acid through pH adjustment. J. Food Sci. 52: 827.
- Brockman, M.C. 1970. Development of intermediate moisture foods for military use. Food Technol. 24: 896.
- Brown, A.D. 1974. Microbial water relations: features of the intracellular composition of sugar-tolerant yeast. J. Bacteriol. 18: 769.
- Buera, M. del P., 1986. "Cinética de las reacciones de pardeamiento no enzimático entre azúcares y glicina en soluciones de alta actividad de agua". Tesis Doctorado. Universidad de Buenos Aires.
- Carrera, P.A. 1974. "Aplicación del método microbiológico al estudio de las características nutricionales de los

alimentos. Vitaminas hidrosolubles.". Tesis Doctorado. Universidad de Buenos Aires.

- 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-hydroxymethyl-furfural accumulation and fluorescence development due to nonenzymatic browning. J. Food Sci. 50: 627.
- Coleman, J.E. y Whitaker, J.R. 1974. Food related enzymes. "Advances in Chemistry Series". Am. Chem. Soc. Washington DC 136: 267.
- Chirife, J.; Ferro Fontán, C. y Benmergui, E.A. 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. Food Technol. 15: 59.
- Chirife, J. y Ferro Fontán, C. 1980. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. V. Experimental investigation of the a_w lowering behaviour of sodium

///

- lactate and some related compounds. J. Food Sci. 45: 802.
- Chirife, J. y Ferro Fontán, C. 1982. Water activity of fresh foods. J. Food Sci. 47: 661.
- Christian, J.H.B. y Waltho, J.A. 1962. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. Biochim. Biophys. Acta 65: 506.
- Christian, J.H.B. y Waltho, J.A. 1964. The composition of Staphylococcus aureus in relation to the water activity of the growth medium. J. Gen. Microbiology 35: 205.
- Davies, R.; Birch, G.G. y Parker, K.J. 1976. Intermediate Moisture Foods". Applied Science Publishers, Londres.
- Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T. y Bohlman, F. 1963. Liebigs Ann. Chem. 661: 1.
- Documenta GEIGY Tablas científicas.1965. Ed. I. Geigy. Basilea, Suiza.
- Doyon, L. y Smyrl, T.G. 1983. Interaction of thiamine with reducing sugars. Food Chem. 12: 127.

- Dwivedi, B.K. y Arnold, R.G. 1972. Chemistry of thiamine degradation. Mechanisms of thiamine degradation in model systems. J. Food Sci. 37: 886.
- Dwivedi, B.K. y Arnold, R.G. 1973. Chemistry of thiamine degradation in food products and model systems: a Review. J. Agr. Food Chem. 21: 54.
- Edwin, E.E. 1979. An improved procedure for the determination of thiamine. Methods in Enzymology. 62: 51.
- Farrer, K.T.H. 1941. The influence of pH on the destruction of aneurin at 100°C. Australian Chem. Inst. J. and Proc. 8: 113.
- Farrer, K.T.H. 1945. The thermal destruction of vitamin B₁.
1. The influence of buffer salts on the rate of destruction of aneurin at 100°C. Biochem. J. 39: 128.
- Farrer, K.T.H. 1947. The thermal destruction of vitamin B₁.
3. The influence of copper on the rate of destruction of aneurin in buffer solutions at 100°C. Biochem. J. 41: 162.
- Farrer, K.T.H. 1955. The thermal destruction of vitamin B₁ in foods. Adv. Food Res. 6: 257.

///

- Feliciotti, E. y Esselen, W.B. 1957. Thermal destruction rates of thiamine in pureed meats and vegetables. Food Technol. 11: 77.
- Fernández, B.E. 1984. "Efecto de diferentes solutos en la cinética de degradación de tiamina en sistemas modelo de alimentos de alta actividad acuosa". M.S. Tesis, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Ferro Fontán, C.; Chirife, J. and Benmergui, E.A. 1979. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. I. a_w prediction in single aqueous electrolyte solutions. J. Food Technol. 14: 625.
- Food and Nutrition Board. 1974. Recommended Dietary Allowances, 8th. ed. National Academy of Sciences. National Research Council, Washington, D.C.
- Fox, M. 1980. "Untersuchungen zur mikrobiologischen Stabilisierung von wasserreichen Lebensmitteln durch kombinierte Verfahren unter Berücksichtigung minimaler Schädigung von Inhaltsstoffen". Tesis, Universidad de Karlsruhe, Alemania.

- Fox, M.; Loncin, M. y Weiss, M. 1982. Investigations into the influence of water activity, pH and heat treatment on the breakdown of thiamine in foods. J. Food Qual. 5: 161.
- Fox, M.; Loncin, M. y Weiss, M. 1983. Investigations into the influence of water activity, pH and heat treatment on the breakdown of 5'-ribonucleotides in foods. J. Food Qual. 6: 11.
- Franks, F. 1983." Water" .1a. edición, The Royal Society of Chemistry, Londres.
- Gould, G.W.; Brown, M.H. y Fletcher, B.C. 1983. "Mechanisms of action of food preservation procedures" en Food Microbiology. Advances and Prospects, ed. por T.A. Roberts y F.A. Skinner, Academic Press, New York.
- Guzmán-Tello, R. y Cheftel, J.C. 1987. Thiamine destruction during extrusion cooking as an indicator of the intensity of thermal processing. Int. J. Food.Sci. and Technol. 22: 549.
- Handbook of Chemistry and Physics. 1977. 57th. edition. CRC Press, Inc. U.S.A..

- Harris, R.S. y Karmas, E. 1975. "Nutritional Evaluation of Food Processing", 1^{ra} edición. AVI Publishing Co: Connecticut.
- Hegsted, D.M. y Ausman, L.M. 1973. Nutrition Today 8: 22.
- Hollenbeck, C.M. y Obermeyer, H.G. 1952. Relative stability of thiamin mononitrate and thiamine chloride in enriched flow. Cereal Chem. 29: 82.
- Hough, G. y Alzamora, S.M. 1984. Optimization of vitamin, texture and color retention during peas blanching. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 17: 209.
- Jansen, B.C.P. y Donath, W.F. 1926. Chem. Weekblad., 23: 201. Citado en: "Fundamentals of Normal Nutrition", Robinson C.H.. Ed. McMillan Publishing Co. Inc., New York y Collier McMillan Publishers, Londres (1978).
- Kanterewicz, R.J. de; Chirife, J. y Lagarde, E.A. de. 1985. Preservation of concentrated cheese whey by combined factors. J. Food Sci., 50: 1629.
- Kaplow, M. 1970. Commercial development of intermediate moisture foods. Food Technol. 24: 889.

- Karel, M. 1973. Recent research and development in the field of low-moisture and intermediate-moisture foods. CRC Crit. Rev. Food Technol. 3: 329.
- Karel, M. 1976. Technology and application of new intermediate moisture foods. En: "Intermediate Moisture Foods". Davies, R. y col.. Applied Science Publishers Ltd., Londres.
- Kirk, J.R. 1981. Influence of water activity on stability of vitamins in dehydrated foods. En: "Water Activity: Influence on Food Quality", 1st. edn. (editado por L.G. Rockland y G.F. Stewart) Academic Press: New York.
- Kitic, D.; Favetto, G.J.; Chirife, J. and Resnik, S.L. 1986. Measurement of water activity in the intermediate moisture range with the Novasina Thermoconstanter Humidity Meter. Lebensm. Wiss. u. Technol. 19: 297.
- Kurata, G.; Sakai, T. y Miyahara, T. 1968. Bitamin. 37(4): 398. Citado por: Dwivedi, B.K. y Arnold, R.G. 1973.
- Labuza, T.P. 1972. Nutrient losses during drying and storage of dehydrated foods. CRC Critical Reviews in Food Technol. 3: 217.

- Labuza, T.P.; Tannenbaum, S.R. y Karel, M. 1970. Water content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. Food Technol. 24: 543.
- Labuza, T.P.; Warren, R. y Warmbier, J. 1977. The physical aspect with respect to water and non-enzymatic browning. Adv. Exp. Med. Biol. 86(8): 379.
- Labuza, T.P. y Kamman, J.F. 1982. Comparison of stability of thiamin salts at high temperature and water activity. J. Food Sci. 47: 664.
- Labuza, T.P. y Riboh, D. 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. Food Technol. 36: 66.
- Lange, P. de y Van der Mijll Dekker, L.P. 1954. A browning reaction between thiamine and glucose. Nature. 173: 1040.
- Lee, F.A. 1958. Adv. Food Res. 8: 63. Citado en "Introducción a la Ciencia de los Alimentos", Fennema O.R. (1982). Ed. Reverté, Argentina.
- Leichter, J. y Joslyn, M.A. (1969). Protective effect of casein on cleavage of thiamine by sulfite. J. Agr.

Food Chem. 17(6): 1355.

- Leistner, L. y Rödel, W. 1975. En: "Water relations of Foods", ed. por R.B. Duckworth. Academic Press, New York.
- Leistner, L.; Rödel, W. y Krispien, K. 1981. Microbiology of meat and meat products in high and intermediate moisture ranges. En: "Water activity: Influence on food quality". Ed. Rockland, L.B. y Stewart, G.F. Academic Press. Londres, New York, San Francisco.
- Lewis, G.N. y Randall, M. Revisado por Pitzer, K.S. 1961. En "Thermodynamics". McGraw-Hill, Londres.
- Lhoest, W.J. 1957. M.S. Thesis (Pharmacy), University of Wisconsin, Madison, U.S.A..
- Lhoest, W.J.; Busse, L.W. y Baumann, C.A. 1958. Nonenzymatic destruction of thiamine. A chromatographic study of the degradation products. J. Amer. Pharm. Ass. 47: 254.
- Lund, D.B. 1975. Effects of commercial processing and storage on nutrients. En: "Nutritional Evaluation of Food Processing" ed. R.S. Harris y E. Karmas. AVI Publishing Co: Connecticut.

///

- Mastrocola, D.; Severini, C. y Lerici, C.R. 1987. Desidratazione per via osmotica della carota. Industria alimentari. 26(2): 133.
- Mauri, L.M. 1984. "Cinética de degradación de tiamina en sistemas modelo acuosos de alta actividad de agua". M.S. Tesis. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Mauron, J. 1981. The Maillard reaction in Food: A Critical review from the nutritional standpoint. En: "Progress in Food and Nutrition Science. Maillard reactions in Foods". Ed. C. Erickson. Pergamon Press, Oxford.
- McCollum, E.V. y Davis, M. 1913. The necessity of certain lipids in the diet during growth. J. Biol. Chem. 15: 167.
- McIntire, F.C. y Frost, D.V. 1944. Thiamine stability: Effect of amino acids and related compounds and of thiamine concentration. J. Am. Chem. Soc. 66: 1317.
- Metzler, D.E. 1960. En "The Enzymes". Ed. Boyer, P.D., Lardy, H. y Merback, C. Academic Press, New York.
- Morrison, R.T. y Boyd, R.N. 1966. "Organic Chemistry". Allyn

and Bacon, Inc. Boston. U.S.A.

- Mosteller, F. 1946. On some useful inefficient Statistics.
Am. Math. Statistics 17: 377.
- Mulley, E.A.; Stumbo, C.R. y Hunting, W.M. 1975 a.
Kinetics of thiamine degradation by heat. A new
method for studying reaction rates in model systems
and food products at high temperatures. J. Food Sci.
40: 985.
- Mulley, E.A.; Stumbo, C.R. y Hunting, W.M. 1975 b.
Kinetics of thiamine degradation by heat. Effect
of pH and form of the vitamin on its rate of
destruction. J. Food Sci. 40: 989.
- Mulley, E.A.; Stumbo, C.R. y Hunting, W.M. 1975 c.
Thiamine: a chemical index of the sterilization
efficacy of thermal processing. J. Food Sci. 40, 993.
- Munro, H.N. 1969. En "Mammalian Protein Metabolism".
Editado por H.N. Munro, Academic Press, New York.
- Norrish, R.S. 1966. An equation for the activity coefficient
and relative humidities of water in confectionary

///

- syrup. J. Food Technol. 1: 25.
- Notermans, S. y Heuvelman, C.J. 1983. Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of Staphylococcus aureus. J. Food Sci. 48: 1832.
- Northolt, M.D.; Verhulsdonk, C.A.H.; Soentoro, P.S.S. y Paulsch, W.E. 1976. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. J. Milk Food Technol. 39: 170.
- Oka y col. 1970. Citado por: Dwivedi, B.K. y Arnold, R.G. (1973). J. Agr. Food Chem. 21: 54.
- 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 nonenzymatic browning. J. Food Sci. 50: 622.
- Pitzer, K.S. y Mayorga, G. 1973. Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. J. Phys. Chem. 77: 2300.

- Pothast, K.; Hamm, R. y Acker, L. 1975. Enzymic reaction in low moisture foods. En "Water relations of foods". Editado por R.B. Duckworth, Academic Press, New York.
- Potter, N.N. 1970. Intermediate moisture foods: Principles and technology. Food Product Dev. 4 .: 38.
- Reed, G. 1966. En "Enzymes in Food Processing". Academic Press, New York.
- Reichardt, C. 1979. "Solvent effects in organic chemistry". Primera edición, Verlag Chemie GmbH, Alemania Occidental.
- Reid, D.S. 1976. Water activity concepts in intermediate moisture foods. En: "Intermediate Moisture Foods". Editado por R. Davies, G.G. Birch and K.J. Parker. Applied Science Publishers Ltd., Londres.
- Resnik, S.L.; Favetto, G.; Chirife, J. y Ferro Fontán, C. 1984. A world survey of water activity values of certain saturated solutions at 25°C. J. Food Sci. 49: 510.
- Rice, E.E. y Beuk, J.F. 1945. Reaction rates for decomposition

of thiamin in pork at various cooking temperatures.
Food Res. 19: 99.

- Robach, M.C. y Stateler, C.L. 1980. Inhibition of Staphylococcus aureus by potassium sorbate in combination with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxanisole or ethylenediamine tetraacetic acid. J. Food Protect 43: 208.
- Robinson, R.A. y Stokes, R.H. 1968. Electrolyte solutions. 2a. edición, Butterworths Publications Limited, Londres.
- Roller, S.D. y Anagnostopoulos, G.D. 1982. Accumulation of carbohydrate by Escherichia coli B/r/1 during growth at low water activity. J. Appl. Bacteriol. 52: 425.
- Ross, K.D. 1975. Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Technol. 29: 26.
- Ryan, M.A. e Ingle, J.D. 1980. Fluorometric reaction rate method for the determination of thiamine. Analytical Chemistry 52: 2177.

- Sajur, S. 1985. "Preconservación de duraznos por métodos combinados". Tesis M.S. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Salunkhe, D.K. 1974. "Storage, Processing and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables". Primera edición, CRC Press: Cleveland, Ohio.
- Sarett, H.P. y Cheldelin, V.H. 1944. The use of Lactobacillus fermentum 36 for thiamine assay. J. Biol. Chem. 155: 153.
- Schwartzberg, H.G. 1982. Solute diffusivities in leaching processes. Food Technol.. 36: 75.
- Scott, W.J. 1953. Water relations of Staphylococcus aureus at 30°C. Aust. J. Biol. Sci.: 6: 549.
- Scott, W.J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Food Res. 7: 83.
- Shimazono, N. y Katsura, E. 1965. Review of Japanese Literature on Beriberi and Thiamine. Vitamin B Research Comitee of Japan.

- Skjöldebrand, C.; Anäs, A.; Oste, R. y Sjödin, P. 1983.
Prediction of thiamine content in convective heated
meat products. J. Food Technol. 18: 61.
- Sperber, W.H. 1983. Influence of water activity on foodborne
bacteria. A Review. J. Food Protect. 46: 142.
- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. 1960. "Principles and Procedures
of Statistics". Primera ed., McGraw-Hill Book Company
Inc., New York.
- Stroebecker, R. y Henning, H.M. 1965. "Vitamin Assay test methods".
Editado por Asociación de Químicos de Vitaminas, USA.
- Tannenbaum, S.R. 1979. "Nutritional and Safety Aspects of
Food Processing". Primera edición.
Marcel Dekker, Inc: New York.
- Tannenbaum, S.R. 1982. Modificaciones químicas y bioquímicas
de los alimentos y su influencia sobre la calidad.
En: "Introducción a la Ciencia de los Alimentos".
O.R. Fennema, Ed. Reverté S.A., Argentina.
- Thompson, D.R. 1982. The challenge in predicting nutrient changes
during food processing. Food Technol. 36: 97.
- Troller, J.A. y Christian, J.H.B. 1978. "Water activity and

food". Academic Press. New York.

- U.S.D.A. 1963. Agriculture Handbook, N° 8. U.S.A., Dept. of Agriculture.
- Van der Poel, G.H. 1956. Participation of B vitamins in non-enzymatic browning reactions. Voeding. 14: 989.
- Voigt, M.N.; Eitenmiller, R.R. y Ware, G.O. 1978. Vitamin assay by microbial and protozoan organisms: response to vitamin concentration, incubation time and assay vessel size. J. Food Sci. 43 : 1418.
- Wai, K.; De Kay, H.G. y Banker, G.S. 1962. Stability of vitamins A, B₁ and C in selected vehicle matrices. J. Pharm. Sci. 51: 1076.
- Watanabe, A. y Marui, T. 1949. Aun. Rept. Takeda Research Lab. 8: 11. Citado por: Dwivedi, B.K. y Arnold, R.G. (1973). J. Agr. Food Chem. 21: 54.
- Wood, B. 1984. Thiamin. J. Food Nutr. 41: 110.

7. TABLAS DE DATOS

.Humectante: NaCl

.Corrida N° 1

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
7,5	64,87
9,5	55,28
13,0	44,20
16,0	35,23
24,0	16,21

.Corrida N° 2

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	75,61
23,5	52,16
51,7	24,70

.Corrida N° 3

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
20,0	86,17
44,2	72,24
69,2	55,62
119,2	35,89

///

.Corrida N° 4

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
7,5	86,08
16,0	64,68
24,0	54,98
30,7	49,42
48,4	30,35

.Corrida N° 5

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
51,7	59,68
77,3	43,50
125,0	23,78
149,0	20,76
173,7	16,00

.Corrida N° 6

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
142,0	64,14
176,3	57,61
228,3	49,79
296,8	38,70

///

.Humectante: KCl

.Corrida N° 7

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
7,5	63,90
9,5	50,42
13,0	41,15
24,0	21,02

.Corrida N° 8

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	90,64
23,5	67,07
29,0	60,54
50,0	37,60
125,0	7,71

.Corrida N° 9

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
20,0	89,60
44,2	75,96
119,2	38,92
116,7	27,22

.Corrida N° 10

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
16,0	65,58
31,0	40,02
48,6	26,07
50,0	24,6

.Corrida N° 11

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
23,5	84,35
51,7	61,06
74,2	51,33
125,0	31,79
149,0	21,85
173,7	13,77

.Corrida N° 12

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
62,2	86,80
142,0	69,63
296,8	41,71
300,0	40,80
368,4	32,01

///

.Humectante: Na₂SO₄

.Corrida N° 13

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
3,0	82,81
7,5	61,11
9,5	50,10
13,0	38,54
16,0	31,60
24,0	19,79

.Corrida N° 14

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	74,89
23,5	53,92
29,0	46,94
74,2	14,13
125,0	3,66

.Corrida N° 15

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
51,0	70,50
93,2	55,10
117,5	43,33
132,8	38,19
176,3	24,23

///

.Corrida N° 16

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
6,0	65,43
11,5	55,49
16,0	48,84
24,0	36,48
48,5	11,84

.Corrida N° 17

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
17,5	78,85
34,8	53,58
51,7	40,48
74,0	29,36
125,0	12,70

.Corrida N° 18

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
62,2	74,52
142,0	44,75
166,5	36,71
228,3	31,53
296,8	24,36
368,4	16,88

///

.Buffer fosfato (sin humectante, $a_w \approx 1$)

.Corrida n° 19

T = 100°C; pH = 5,5

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
3,0	75,32
7,5	45,39
9,5	37,78
13,0	32,84
16,0	24,43
24,0	11,00

.Corrida N° 20

T = 90°C; pH = 5,5

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	68,06
23,5	44,54
29,0	31,50
51,7	18,82

.Corrida N° 21

T = 80°C; pH = 5,5

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
25,5	63,26
50,0	49,10
93,2	26,60
142,0	15,73

.Corrida N° 22

T = 100°C; pH = 4,0

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
7,5	66,61
13,0	58,50
24,2	32,87
31,0	22,87
43,0	11,82
48,6	8,97

.Corrida N° 23

T = 90°C; pH = 4,0

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
23,5	73,84
51,7	40,93
74,2	19,99
125,0	9,84

.Corrida N° 24

T = 80°C; pH = 4,0

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
62,2	72,03
166,5	31,78
228,3	23,73
296,8	16,53

.Humectante: Sorbitol

.Corrida N° 25

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
2,0	77,04
6,0	46,43
7,5	42,59
9,5	29,34
13,0	20,53

.Corrida N° 26

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
5,0	64,98
10,0	53,83
17,5	35,02
24,6	22,61
29,0	18,56

.Corrida N° 27

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
17,5	58,27
41,5	35,40
62,2	24,89
93,2	17,51
117,5	11,59
142,0	8,02

///

.Corrida N° 28

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
3,0	89,61
7,5	51,13
9,5	43,03
16,0	30,76
24,0	19,88

.Corrida N° 29

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	79,33
23,5	56,85
29,0	49,54
34,8	40,70
51,7	27,37
74,2	15,42

.Corrida N° 30

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
25,5	86,08
62,2	75,78
94,0	47,95
132,8	38,87
142,0	31,48
200,3	19,71

.Humectante: Glicerol

.Corrida N° 31

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
2,0	83,55
4,5	65,27
6,0	50,82
7,5	45,27
13,0	25,55

.Corrida N° 32

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
5,0	82,85
10,0	67,69
17,5	45,85
24,6	32,94
29,0	21,12
51,7	7,58

.Corrida N° 33

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
17,5	80,18
41,5	55,09
62,2	31,14
93,2	15,61
117,5	8,68
142,0	6,93

///

.Corrida N° 34

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
3,0	83,21
7,5	59,85
9,5	51,17
13,0	39,84
24,0	20,71

.Corrida N° 35

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	80,83
23,5	58,42
29,0	51,82
34,8	43,51
74,2	17,81

.Corrida N° 36

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
25,5	75,00
62,2	62,50
94,0	42,86
132,8	31,25
142,0	27,68
200,3	15,71

///

.Humectante: Propilenglicol

.Corrida N° 37

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
2,0	88,27
4,5	70,29
6,0	56,95
7,5	50,90
9,5	38,51
13,0	27,25

.Corrida N° 38

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
5,0	90,22
10,0	75,89
17,5	53,12
24,6	42,31
29,0	36,90
61,7	10,91

.Corrida N° 39

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
17,5	86,50
41,5	55,28
93,25	21,27
117,5	15,36
142,0	11,31

///

.Corrida N° 40

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
3,0	80,15
7,5	60,39
9,5	51,47
13,0	41,73
16,0	32,63
24,0	23,35

.Corrida N° 41

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	86,90
23,5	56,42
29,0	49,02
34,8	43,82
51,7	27,76
74,2	17,71

.Corrida N° 42

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
25,5	77,38
62,2	60,56
94,0	44,83
132,8	31,40
142,0	30,47
200,3	16,26

///

.Humectante: Glucosa

.Corrida N° 43

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
2,0	77,24
4,0	67,90
6,0	43,11
9,5	24,45
13,0	15,71

.Corrida N° 44

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
5,0	67,30
10,0	37,47
17,5	23,46
24,6	20,18

.Corrida N° 45

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
17,5	76,04
41,5	66,60
62,2	43,14
93,2	19,78
117,5	18,59

///

.Corrida N° 46

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
3,0	53,85
4,0	51,11
6,0	45,33
8,8	29,90
13,0	14,27
16,0	13,42

.Corrida N° 47

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	56,41
23,5	25,21
34,8	24,36
51,7	11,79
74,2	7,44

.Corrida N° 48

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
62,2	48,29
94,0	22,56
117,5	13,67
142,0	10,85
190,5	8,29

///

.Humectante: Sacarosa

.Corrida N° 49

T = 100°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
2,0	52,39
4,5	29,35
6,0	28,41
9,5	17,97
13,0	16,23

.Corrida N° 50

T = 90°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
5,0	56,52
10,0	62,32
23,5	27,75
24,6	24,27
29,0	26,09
51,7	9,42

.Corrida N° 51

T = 80°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
17,5	52,9
41,5	36,96
62,2	35,22
93,2	14,57
117,5	10,15

///

.Corrida N° 52

T = 100°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
7,5	60,13
13,0	32,81
16,0	21,96
24,2	11,03

.Corrida N° 53

T = 90°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
9,2	54,38
34,8	41,83
51,7	24,18
74,2	9,54

.Corrida N° 54

T = 80°C; pH = 4,0; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
25,5	59,61
62,2	49,15
117,5	14,77
142,0	10,85
190,5	7,19

///

.Humectante: NaCl

.Corrida N° 55*

T = 55°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
43,7	98,27
66,5	99,07
171,5	93,50
<u>219,0</u>	<u>91,33</u>

.Humectante: KCl

Corrida N° 56*

T = 55°C; pH = 5,5; a_w = 0,95

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
43,7	98,31
66,5	95,43
95,7	96,08
171,5	94,45
219,0	92,17
313,5	89,24
486,5	83,03
<u>697,0</u>	<u>75,86</u>

///

.Buffer fosfato (sin humectante)

.Corrida N° 57*

T = 55°C; pH = 5,5; $a_w \cong 1,00$

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
66,5	97,96
95,75	95,91
171,5	92,17
219,0	89,46
313,5	80,27
486,5	76,87

.Humectante: Glicerol

.Corrida N° 58*

T = 55°C; pH 5,5; $a_w = 0,95$

Tiempo (horas)	Tiamina remanente (%)
0	100
94,5	94,70
237,7	88,42
334,5	81,40
507,5	71,80
718,0	62,60
1004,5	51,90

*A pesar de que en estas cuatro corridas a 55°C se llegó a altos porcentajes de tiamina remanente (>50%) se calcularon las constantes de primer orden dado los resultados obtenidos en el resto de las condiciones de trabajo.

///

APENDICE A

CALCULO DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD

El cálculo de las constantes de velocidad (k) y la estimación de su error se realizó a través del método propuesto por Boquet (1984). En el mismo se parte de una serie de puntos $\{c_i, t_i\}$, que para esta reacción se distribuyen a lo largo de una recta al correlacionar $\ln c_i$ o $\ln c_i/c_0$ en función del tiempo. La ecuación que representa dicha correlación, en el caso de degradación térmica de tiamina, tal como ya se ha discutido, es:

$$\ln c_i/c_0 = -k t_i \quad (A.1)$$

donde c_i = concentración de tiamina a tiempo t_i

c_0 = concentración inicial de tiamina

t_i = tiempo

La ecuación A.1 se puede expresar en la forma:

$$\ln c_i = \ln c_0 + k't = a + k't_i \quad (A.2)$$

donde: $k' = -k$

///

En el análisis propuesto se supone que los t_i se midieron sin error y que los valores de c_i tienen una misma distribución normal de Gauss alrededor de cada punto, con la misma dispersión (σ_{c_i}). La variable $\ln c_i$ no presenta dispersión constante y la misma puede expresarse como:

$$\sigma_{\ln c_i} \cong \frac{1}{c_i} \sigma_{c_i} \quad (\text{A.3})$$

donde $\sigma_{c_i} \cong \sigma_{c_0}$

En estas condiciones debe usarse el método de cuadrados mínimos ponderados. Al aplicar el mismo, el peso de una observación (w_i) es:

$$w_i = \frac{1}{(\sigma_{\ln c_i})^2} = \frac{c_i^2}{\sigma_{c_0}^2} \quad (\text{A.4})$$

con lo cual la función "Chi cuadrado" será:

$$\chi^2 = \frac{1}{\sigma_{c_0}^2} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{\ln c_i - a - k't_i}{1/c_i} \right)^2 = S_p^2 \quad (\text{A.5})$$

///

Esta es una función tal que el mínimo de la misma corresponde al máximo de probabilidad de que un conjunto de n datos esté acotado en el intervalo (c_i, c_i+dc_i) .

Es decir, derivando respecto de la variable \underline{a} cuando \underline{k}' es constante y respecto de \underline{k} cuando \underline{a} es constante (A.6) se obtienen dos ecuaciones (A.7 y A.8) que permiten despejar los valores más probables de \underline{a} (\hat{a}) y de \underline{k}' (\hat{k}').

$$\left. \frac{\partial S^2}{\partial a} \right)_{k'} = \left. \frac{\partial S^2}{\partial k'} \right)_{a} = 0 \quad (\text{A.6})$$

$$[c^2] \hat{a} + [c^2 t] \hat{k}' = [c^2 \ln c] \quad (\text{A.7})$$

$$[c^2 t] \hat{a} + [c^2 t^2] \hat{k}' = [c^2 t \ln c] \quad (\text{A.8})$$

donde:

$$[c^2] = \sum_{i=1}^n c_i^2$$

$$[c^2 t] = \sum_{i=1}^n c_i^2 t_i$$

$$[c^2 \ln c] = \sum_{i=1}^n c_i^2 t_i \ln c_i$$

$$[c^2 t \ln c] = \sum_{i=1}^n c_i^2 t_i \ln c_i$$

El sistema de las ecuaciones A.7 y A.8 puede escribirse como:

///

$$\begin{vmatrix} [c^2] & [c^2 t] \\ [c^2 t] & [c^2 t^2] \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} \hat{a} \\ \hat{k}' \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} [c^2 \ln c] \\ [c^2 t \ln c] \end{vmatrix} \quad (\text{A.9})$$

A

Resolviendo por la regla de Cramer queda:

$$\hat{a} = \frac{\begin{vmatrix} [c^2 \ln c] & [c^2 t] \\ [c^2 t \ln c] & [c^2 t^2] \end{vmatrix}}{[c^2] [c^2 t^2] - [c^2 t]^2} \quad (\text{A.10})$$

$$\hat{k}' = \frac{\begin{vmatrix} [c^2] & [c^2 \ln c] \\ [c^2 t] & [c^2 t \ln c] \end{vmatrix}}{[c^2] [c^2 t^2] - [c^2 t]^2} \quad (\text{A.11})$$

Para evaluar el error (Δk) en el cálculo de las constantes se procedió de la siguiente manera.

En primer lugar la dispersión de los valores de c_i puede calcularse a través del estimador S_c^2 (desviación standard de la concentración elevada al cuadrado), cuya expresión es:

///

$$S_c^2 = \frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n [c_i - \exp(\hat{a} + \hat{k}'t_i)]^2 \quad (\text{A.12})$$

Luego la desviación standard de las constantes de velocidad

($S_{\hat{k}'}$) resulta del cálculo:

$$S_{\hat{k}'}^2 = S_c^2 \cdot B(2,2) \quad (\text{A.13})$$

donde $B(2,2)$ es el elemento (2,2) de la matriz $\underline{\underline{B}}$. La matriz $\underline{\underline{B}}$ es:

$$\underline{\underline{B}} = \underline{\underline{A}}^{-1} = \frac{1}{\begin{bmatrix} [c^2] & [c^2t^2] \\ [c^2t] & [c^2t^2] \end{bmatrix} - [c^2t]^2} \begin{vmatrix} [c^2t^2] & -[c^2t] \\ -[c^2t] & [c^2] \end{vmatrix} \quad (\text{A.14})$$

luego,

$$B(2,2) = \frac{[c^2]}{\begin{bmatrix} [c^2] & [c^2t^2] \\ [c^2t] & [c^2t^2] \end{bmatrix} - [c^2t]^2} \quad (\text{A.15})$$

Utilizando una calculadora programable (Texas, TI59) se calcularon los valores más probables de las constantes de velocidad ($\hat{k} = -k'$) y sus desviaciones standard (S_k).

El error porcentual ($\epsilon\%$) se calculó como:

$$\epsilon\% = \frac{\Delta k}{k} \times 100 \quad (\text{A.16})$$

///

siendo S_k el equivalente al Δk para un número infinito de datos; para un número finito de pares de valores y para un intervalo de confianza de 0,95, el Δk se puede expresar como:

$$\Delta k = \frac{S_k \cdot t_{0,05}}{\sqrt{n-1}} \quad (\text{A.17})$$

donde $t_{0,05}$ es el valor t de "Student" (Steel y Torrie, 1960) y n es el número de mediciones.

///

APENDICE B

CALCULO DE LA ENERGIA DE ACTIVACION

Para el cálculo de los valores de energía de activación se siguió también el procedimiento propuesto por Boquet (1984).

El mismo supone las mediciones de temperatura con un error insignificante. La dependencia de la constante de velocidad con la temperatura, como se desarrolló en el punto 4.2, se expresa a través de la ecuación de Arrhenius:

$$k = k_0 \cdot e^{-E_a/RT} \quad (B.1)$$

Tomando los valores de k tal como fueron calculados en el apéndice A, la ecuación B.1 puede ser linealizada como:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} = a + \frac{b}{T} \quad (B.2)$$

pero ahora se tiene un conocimiento de la dispersión de k_i :

$$\sigma_{\ln k_i} \cong \frac{1}{k_i} ; \quad \sigma_{\hat{k}_i} \cong \frac{1}{k_i} S_{\hat{k}_i} \quad (B.3)$$

///

Luego, se debe hacer mínima la expresión:

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{\ln k_i - a - \frac{b}{T}}{S_{k_i}/k_i} \right)^2 \quad (\text{B.4})$$

LLamando $w_i = \frac{k_i^2}{S_k^2}$, resulta

$$\begin{matrix} \left[\begin{array}{c} [w] - [\frac{w}{T}] \\ [\frac{w}{T}] - [\frac{w}{T^2}] \end{array} \right] \\ \underline{\underline{A}} \end{matrix} \begin{matrix} \left[\begin{array}{c} \hat{a} \\ \hat{b} \end{array} \right] \\ \underline{\underline{B}} \end{matrix} = \begin{matrix} \left[\begin{array}{c} [w \ln k] \\ [\frac{w}{T} \ln k] \end{array} \right] \\ \underline{\underline{C}} \end{matrix} \quad (\text{B.5})$$

$$\text{siendo } \hat{E}_a = -R \cdot \hat{b}, \quad \text{si } \underline{\underline{B}} = \underline{\underline{A}}^{-1} \quad (\text{B.6})$$

$$S_{\hat{b}}^2 = -B(2,2) \text{ y } S_{\hat{E}_a} = R \cdot S_{\hat{b}} \quad (\text{B.7})$$

A través del programa correspondiente para la TI59, se calcularon los valores de E_a y S_{E_a} para todos los sistemas modelo en estudio. Los valores de ΔE_a y $\epsilon\%$ se estimaron de la misma forma que la explicada para las constantes de velocidad en el apéndice A.

///