

300627

25

24



**UNIVERSIDAD LA SALLE**

**Escuela de Química**

**Incorporada a la U. N. A. M.**

**"ESTUDIO SOBRE LA EXTRACCION Y CUANTIFICACION  
DE COMPUESTOS PECTICOS EN DOS ESPECIES  
FRUTICOLAS"**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**Químico Farmacéutico Biólogo**

**P R E S E N T A :**

**BERTHA CECILIA VELEZ GUZMAN**

**México, D. F.**

**1986**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

	Página
RESUMEN.....	5
OBJETIVOS.....	4
CAPITULO 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	5
1.1 Historia, Estudios Preliminares de Sustancias Péclicas, Descubrimiento y Estudios Posteriores.....	6
1.2 Composición Química y Estructura.....	6
A. Propiedades Físicas.....	10
B. Propiedades Químicas.....	11
C. Extracción de Pectinas.....	17
1.3 Clasificación de Pectinas con Base a su Solubilidad.....	19
1.4 Nomenclatura, Designación de las - Sustancias Péclicas.....	21
1.5 Estado Natural y Función de los - Compuestos Péclicos en las Plantas....	25
CAPITULO 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	30
2.1 Preparación de Materia Prima.....	31
2.2 Materiales y Equipo.....	34
2.3 Metodología.....	35
a. Técnicas Analíticas para la De- terminación del Estado de Madurez en las Frutas.....	35
b. Extracción de Sólidos Insolubles en Alcohol.....	36

	Página
c. Determinación de Fracciones - Pécticas.....	36
d. Método Colorimétrico para la Cuantificación de Sustancias Pécticas.....	40
e. Preparación de la Curva Patrón con Acido Galacturónico.....	41
f. Evaluación Estadística de los Resultados.....	43
 CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	 47
 CAPITULO 4. CONCLUSIONES .....	 82
 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	 87
 APENDICES.....	 94

## RESUMEN.

La bibliografía especializada recomienda técnicas analíticas que son consideradas adecuadas en cuanto a precisión para la evaluación de sustancias pécticas presentes en los frutos. Algunos de los factores limitantes de aplicación de dichas técnicas los constituyen la dificultad de operación, la escasa confiabilidad de los resultados y la finalidad del estudio al que son dirigidas cuando se varía de especie (e inclusive dentro de estados de madurez en un mismo espécimen).

Dentro de la gama de técnicas para la extracción de compuestos pécticos se seleccionó la desarrollada por Rouse y Atkins (1955) al ser una de las más usadas por su facilidad de operación y confiabilidad de los resultados que se obtienen; con el objeto de recuperar mayor cantidad de sustancias pécticas se llevó a cabo la modificación de ciertas condiciones de operación entre las que se incluyeron: temperatura, número de lavados, volumen de extracción y tiempo de agitación.

Una vez establecidas las condiciones más adecuadas, se ensayó la técnica modificada sobre Naranja Valencia (cáscara) y Mango Kent (pulpa) por ser de importancia económica en nuestro país, además de estar incluidos dentro de los frutos que poseen cantidad considerable de compuestos pécticos en su estructura fisiológica. Los resultados se expresaron como porcentaje de Acido Galacturónico presente en la fruta y en ambos casos se mostró incremento en la recuperación de tales compuestos, los cuales al analizarse estadísticamente tuvieron elevada precisión, encontrándose mediante el cálculo de la " t de Student " que el método no difiere al efectuarse en días diferentes.

**OBJETIVOS.**

- 1.- Modificar una técnica analítica para la evaluación de compuestos pécticos basada en propiedades de solubilidad, características para cada uno y en función de su precisión, para establecer las condiciones más adecuadas con la finalidad de lograr mayor recuperación de los mismos.
  
- 2.- Realizar el estudio práctico correspondiente a la técnica modificada sobre Naranja Valencia (cáscara) y -- Mango Kent (pulpa), (frutos que difieren en composición química) para su aplicación posterior en estudios fisiológicos y de calidad.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS



## 1.1 HISTORIA. ESTUDIOS PRELIMINARES DE SUSTANCIAS PECTICAS. DESCUBRIMIENTO Y ESTUDIOS POSTERIORES.

La pectina cuyo nombre se deriva del vocablo griego - "pektos", que significa "coagular ó solidificar". fué descubierta por Vauquelin (1790) quién estudió sus componentes químicos. los cuales no fueron verdaderamente caracterizados, por Braconnot (1825), que realizó un estudio más amplio incluyendo la desesterificación para la producción de ácido péctico, así como la importancia del pH y la cantidad de azúcar en la elaboración de jaleas (designando el principio gelatinoso de las frutas) (14 y 25).

Posteriormente, Fremy (1840) descubrió otro constituyente péctico llamado "pectosa", la cual se conoce ahora como - "protopectina" el precursor de la pectina. Las extensas investigaciones realizadas en los cien años siguientes, esclarecieron las propiedades de las sustancias pécticas pero hicieron poco por aclarar su naturaleza química.

En 1916 Ehrlich y Suárez aislaron el ácido D-galacturónico que en forma de polímero es el integrante principal de todas las pectinas. Joslyn efectuó una revisión de la química propia de la protopectina (14). Se han llevado a cabo estudios más recientes de sustancias pécticas en frutas y vegetales (1, 31 y 32)

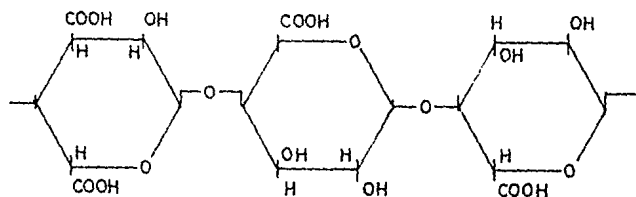
## 1.2 COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURA.

La composición química de las sustancias pécticas es compleja, sin embargo, su análisis elemental demuestra que están formadas de carbono, hidrógeno y oxígeno en tales proporciones que permiten considerar a las sustancias pécticas

como hidratos de carbono (37).

La estructura básica de las pectinas está formada por moléculas de ácido D-galacturónico ( $C_6H_{10}O_7$ ) unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -D-(1-4) constituyendo el ácido poligalacturónico(1), el cual se muestra en la Figura No. 1.

FIG. No. 1 FORMULA DESARROLLADA DEL ACIDO POLIGALACTURONICO



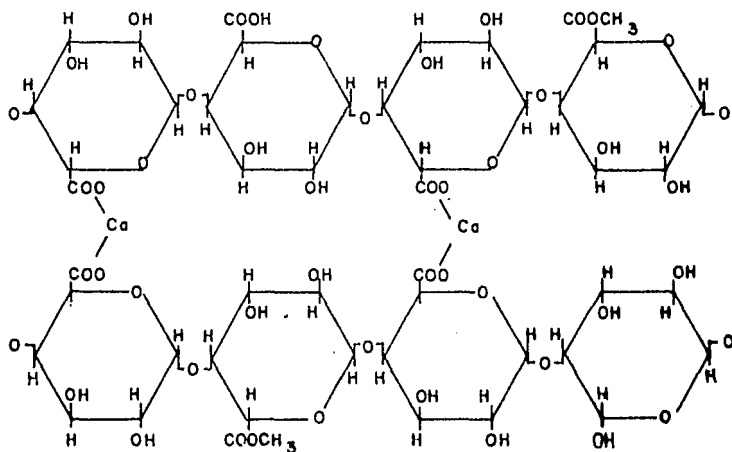
Fuente: Alcalá, L.G., y Sosa, G.C. (1)

En donde algunos de sus grupos carboxílicos están esterificados con metanol, otros neutralizados con cationes y otros como ácidos libres (35). (Ver Figura No. 2)

Se han detectado arabinosa, galactosa y ramnosa en pectina cítrica como componentes del polímero a largos intervalos ó como cadenas laterales del mismo (7,27).

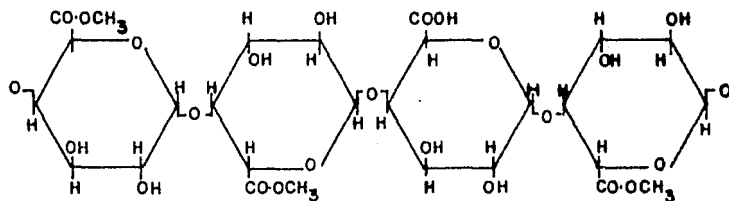
Existen indicios de que otros elementos se pueden unir al polímero, ya sea por enlace glucosídico, por puentes de hidrógeno, formación de anhídridos, formación de lactonas ó enlaces de iones polivalentes en pequeña proporción (1).

Como puede observarse en la Figura No. 3, la composición química de los ácidos pectínicos puede representarse por una cadena constituida por eslabones de ácido anhidrogalacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ (1-4) y en los que parte de los grupos



FUENTE: ROUSE, A. H., (36)

FIG. 3 ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DE ACIDO PECTINICO



FUENTE: ROYO, I. J., (37)

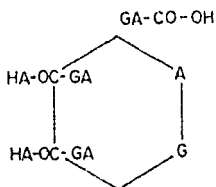
carboxílo se han sustituido por grupos metoxilo (15).

En cuanto a su composición química, un ácido pectínico se caracteriza por el tamaño de su molécula, por el grado de esterificación y por la proporción de lastre presente (azúcares asociados: pentosanas y hexosanas) (27).

Las diferencias entre las propiedades que caracterizan a los ácidos pectínicos naturales u obtenidos a partir de la protopectina de las plantas son consecuencia del porcentaje de metoxilos en la molécula(37).

Los ácidos pectínicos están constituidos por moléculas de ácido poligalacturónico asociados a moléculas de determinados azúcares (lastre); tal como se muestra en la Figura No.4.

FIG. No. 4 ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DE ACIDO PECTICO.



Donde:

GA= Acido Galacturónico

A = Arabinosa.

G = Galactosa.

Fuente: Royo, I.J., (37)

No existe uniformidad de criterio respecto a la composición química de la protopectina. Ehrlich postuló que la protopectina era una sal cálcica y magnésica de los ácidos pectínicos(14), y Bonner sugirió que está constituida por moléculas grandes de ácidos pectínicos (37).

La pectina tiene una estructura relativamente compleja en relación a la celulosa y el almidón, pero son comparables

ya que están compuestas de residuos, una de anhidroaldohexosas y la otra de anhidroaldohexosas oxidadas en uniones en cadena 1-4. No obstante esta similitud, las sustancias pécticas son muy heterogéneas, por ejemplo, la pectina está compuesta de cadenas de galacturónidos y tiene una gran variedad de peso molecular. Algunos grupos carboxilo están esterificados con alcohol metílico, otros con cationes y otros más quedan como ácidos libres; además las pectinas varían en la distribución de grupos éster a lo largo de las cadenas (10).

#### A. PROPIEDADES FÍSICAS.

Como polímero del ácido galacturónico las sustancias pécticas tienen propiedades físicas únicas primariamente debido al grupo carboxilo que le imparte propiedades muy diferentes a las de otros carbohidratos que no tienen grupos ionizables. Los carboxilos de las pectinas pueden estar en forma ionizada  $\text{COO}^-$  a pH mayores de 3, en forma no ionizada  $\text{COOH}$  a pH menores de 3 ó metilados  $\text{COOCH}_3$ . En cada caso, tienen diferente capacidad de interaccionar con los otros constituyentes de los alimentos; los carboxilo ionizados son los que le imparten la mayor reactividad al polímero. Muchas de las propiedades de estos carbohidratos están determinadas por la relación de concentración entre los carboxilo libres y los carboxilo metilados (3).

Las pectinas se extraen comercialmente de las cáscaras de frutas cítricas utilizando diferentes ácidos diluidos bajo ciertas condiciones de temperatura (12). Durante la extracción se debe controlar la concentración de ácido y la temperatura, ya que estos factores pueden inducir cambios químicos en su estructura, como la hidrólisis de los enlaces éster y el glucosídico ó bien en depolimerización de la cadena. Las propiedades físicas de la pectina así extraída, cambiarán de-

acuerdo con la intensidad del tratamiento ácido-térmico. (3)

La pectina purificada y seca es un sólido blanco ó ligeramente coloreado; en agua forma grumos viscosos por fuera y secos por dentro, para ayudar la dispersión de pectina se mezcla con azúcar y sales amortiguadoras ó se humedece con etanol antes de añadirle agua (36), también es soluble en formamida, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y glicerol tibio. Las pectinas y los pectatos pueden precipitarse con solventes orgánicos miscibles en agua, con detergentes cuaternarios, polímeros básicos solubles en agua, proteínas y con cationes polivalentes (32).

El promedio de peso molecular en pectinas varía entre 30,000 y 300,000 g mol según el origen, método de preparación y método de medición (16). La viscosidad en las soluciones acuosas depende del peso molecular y está influenciada por el grado de esterificación, concentración, pH, grado de metilación y concentración de electrolitos capaces de formar sales con los ácidos pectínicos (36). El ácido péctico y los ácidos pectínicos son solubles sólo después de una neutralización parcial (28 y 32).

## B. PROPIEDADES QUIMICAS .

Se producen principalmente dos clases de pectina para dos tipos de geles:

- Pectinas altamente metoxiladas (60-75% de esterificación).
- Pectinas poco metoxiladas (20-45% de esterificación) para geles pectinato de calcio.

La formación del primer tipo de gel ocurre cuando las moléculas de pectina se agrupan por enlaces de hidrógeno después

de la deshidratación (adición de azúcar) y después de la re- presión de grupos carboxilo disociados fuertemente hidrata - dos (adición de ácido). Los tres constituyentes pueden reem - plazarse con ciertos límites. Los factores que influyen en - la fuerza del gel son: peso molecular, concentración de pec - tina, azúcar, temperatura y el grado de esterificación. Con - centraciones altas de azúcar y/o pectina permiten la manufac - tura de jaleas soportando temperaturas de cocimiento. (32).

La formación de un gel pectina-azúcar-ácido-agua sigue la siguiente secuencia:

En un sustrato ácido de fruta, la pectina es un coloide cargado negativamente. La adición de azúcar influencia el - equilibrio pectina-agua establecido y desestabiliza la pec - tina, ella conglomerada y establece una malla de fibras, capaz de soportar líquidos. La continuidad de la malla formada por la pectina y la densidad de las fibras formadas, se estable - cen por la concentración de pectina; a mayor concentración de azúcar, menos agua soporta la estructura. La flexibilidad de - las fibras en la estructura está controlada por la acidez del sustrato; la formación del gel ocurre a un pH cercano a 3.2, a valores menores la resistencia del gel disminuye y a valores mayores de 3.5 no se forma el gel en el rango usual de sólidos solubles (65%). La cantidad de pectina requerida para la formación del gel depende de la calidad de la pectina (3 y 42)

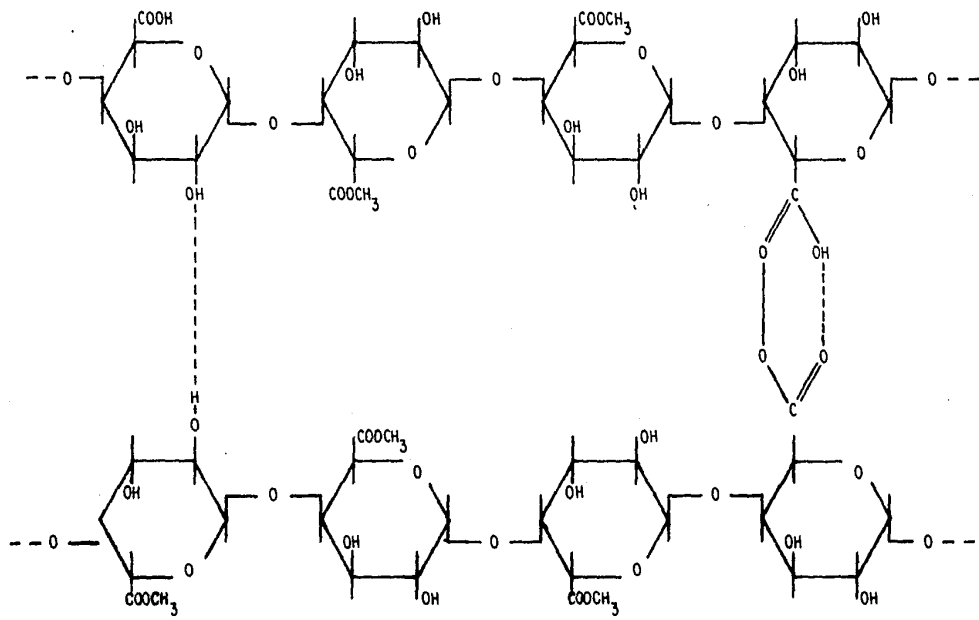
La estructura química de la formación del gel pectina - azúcar-ácido se presenta en la Figura No. 5.

Las pectinas de gelificación rápida poseen grado de ge - lificación de al menos 70% y las pectinas lentas del 50 al 70%

La reactividad de pectinas de bajo metoxilo con iones cal-

ESTRUCTURA QUIMICA DE LA FORMACION DEL GEL PECTINA-AZUCAR-ACIDO

FUENTE: BRAVERMAN, J. B. S. (5)





cio, es usada para la elaboración de juleas dietéticas (sin azúcar ó con poca). Este tipo de pectina tiene un mayor número de grupos  $\text{COO}^-$  libres que interaccionan facilmente con iones calcio:  $(-\text{COO}-\text{Ca}-\text{OOC}-)$ , formando estructuras tridimensionales entre cadenas adyacentes de polímeros. Aunque la adición de azúcar no es necesaria, generalmente se añade para mejorar la textura del gel (3)

Una pectina es mejor para la formación de geles, cuanto mayor sea su grado de polimerización y el contenido de metoxilos bajo.

Los ácidos pectínicos de bajo metoxilo se encuentran en frutos pero al extraerlos son de bajo grado de polimerización y propiedades desfavorables (37).

Para preparar ácidos pectínicos de bajo metoxilo se pueden seguir tres métodos: tratamiento con ácidos, con álcali ó con enzimas. (36)

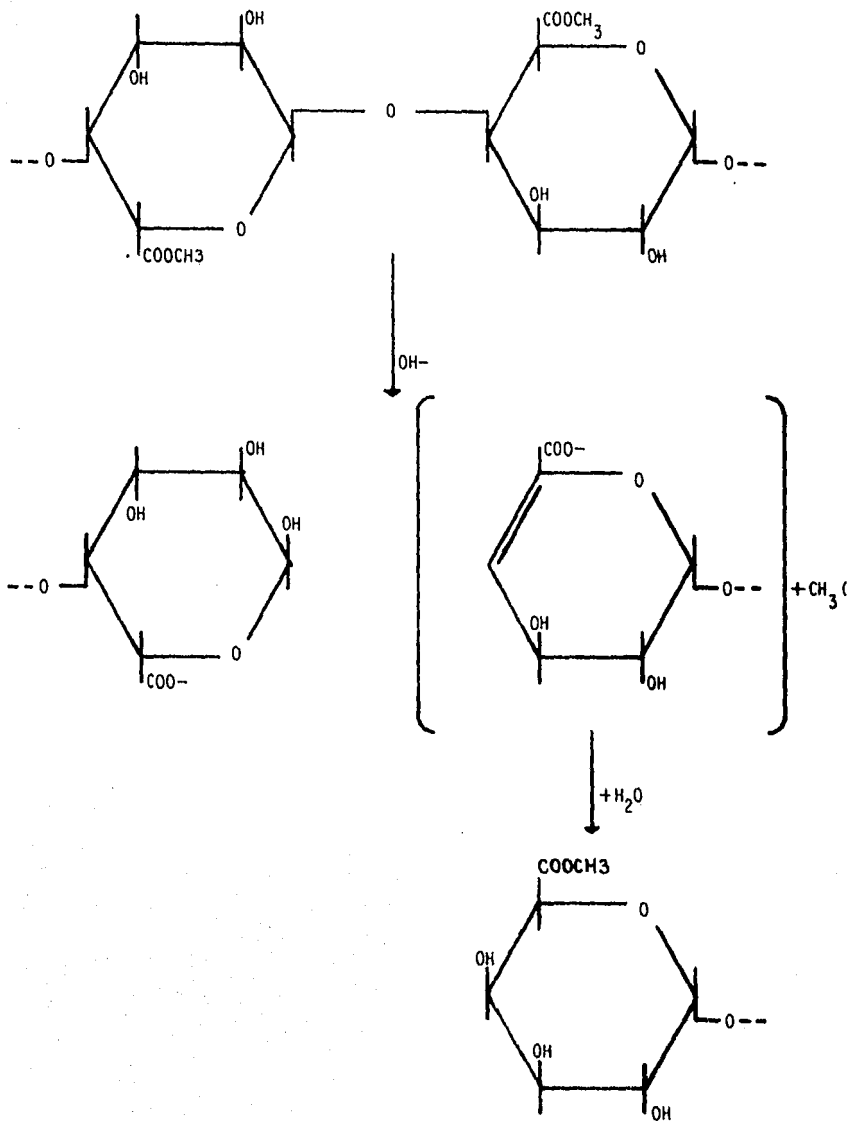
- La desesterificación ácida tiene una Energía de activación de 17,000 cal. y la glucosidólisis 30,000 cal. A bajas temperaturas, la desesterificación procede más rápidamente que la depolimerización (10).

- Se ha sugerido que los álcalis catalizan una reacción por  $\beta$  eliminación como se muestra en las fórmulas de la Fig. 6.

La desesterificación química se realiza al azar, la desesterificación enzimática catalizada por pectinesterasa es específica. La hidrólisis glucosídica de la pectina se lleva a cabo con poligalacturonasa (10)

La eliminación parcial de los metoxilos de una pectina y el método seguido lleva consigo variación en sus propiedades físicas (viscosidad de las diluciones, pH óptimo, grado y velo-

FUENTE: BRAVERMAN, J.B.S. (5)



cidad de gelificación. (37)

Otra de las transformaciones de las sustancias pécticas es la neutralización total ó parcial de grupos carboxilo mediante álcalis, obteniéndose los pectatos ó pectinatos neutros ó ácidos.

Las pectinas en polvo con menos del 10% de humedad almacenadas a temperatura ambiente sufren poca alteración, en cambio si se trata de pectina disuelta, la viscosidad se vá perdiendo gradualmente, el envejecimiento tiene lugar aún por debajo de cero grados, aumentando su velocidad con un incremento en la temperatura (29y37)

La degradación y descomposición de pectina es causada por agentes oxidantes como: ácido peryódico, permanganato, peróxido de hidrógeno, dicromato, cloruro, dióxido de cloro, bromuro y ácido ascórbico. Los agentes oxidantes disminuyen la viscosidad y el poder gelificante de la pectina. La velocidad de degradación depende de la temperatura, pH y concentración del agente oxidante (36)

Al estudiar los cambios estacionales que ocurren en los constituyentes químicos de los tejidos de frutos, se encontró que los carbohidratos se debían separar en una fracción soluble y otra insoluble en alcohol (48)

La fracción soluble en alcohol consiste principalmente de carbohidratos solubles (mono y disacáridos) y ácidos orgánicos, aminoácidos, dipéptidos, aceites esenciales, pigmentos y flavonoides de la cáscara.

Los sólidos insolubles en alcohol incluyen los componentes estructurales de la pared celular como: celulosa, lignina, proteínas, sustancias pécticas (protopectina y pectina) y hemicelulosa que están muy relacionadas en la planta, especialmente

en las dos últimas.

### C. EXTRACCION DE PECTINAS.

La materia prima ideal para la preparación de pectina de buena calidad debe proceder de frutos que habiendo adquirido su máximo tamaño, no hayan llegado a su grado óptimo de madurez (38).

Durante la extracción de pectinas, la primera operación tiene por objeto reducirla a pequeños fragmentos para facilitar el contacto con los disolventes que se trate (14). Posteriormente, la masa se calienta con el objeto de inactivar las enzimas presentes; se eliminan las sustancias solubles en etanol, arrastrándose también ciertas pectinas solubles cuya pérdida no tiene importancia por su bajo poder gelificante, ya que rebajarían la calidad del producto final (38)

La extracción fraccional de compuestos pécticos (procedentes de los Sólidos Insolubles en Alcohol), los distribuye en tres categorías:

- (1) Sustancias pécticas altamente metoxiladas (solubles en agua fría).
- (2) Sustancias pécticas poco metoxiladas ó ácido péctico (solubles en soluciones diluídas de agentes secuestrantes del calcio, como oxalato de amonio).
- (3) Protopectina (soluble en hidróxido de sodio frío, ó hirviendo la solución con ácido).

Así se separan las fracciones de sustancias pécticas de acuerdo a sus propiedades de solubilidad características (52)

El material que permanece después de la extracción de pectinas se compone principalmente de celulosa y hemicelulo -

sa unida firmemente a una pequeña cantidad de pectina, difícil de extraer y determinar cuantitativamente, ya que los extractantes también disuelven la hemicelulosa. (48)

Las propiedades físicas y químicas de las pectinas se ven afectadas por la fuente, método de extracción y el tratamiento subsecuente. (14)

La bibliografía reporta diversas técnicas analíticas para la extracción de compuestos pécticos entre las que se encuentran las desarrolladas por los autores citados a continuación:

- |                                 |      |
|---------------------------------|------|
| (1) Rangana, S.                 | (35) |
| (2) Rouse, A.H. y Atkins, C.D.  | (34) |
| (3) Rouse, A.H., et al.         | (35) |
| (4) Showfelt, A.L., et al       | (46) |
| (5) Somogi, L.P. y Romani, R.J. | (50) |

Las cuales presentan las siguientes características principales:

- En las técnicas 1, 3, 4 y 5 se parte de Sólidos Insolubles en Alcohol (SIA) como materia prima para la extracción, mientras que en la técnica 2 se parte de jugos ó fruta fresca.
- Todas las técnicas anteriores se basan en el uso de los mismos disolventes (agua destilada, oxalato de amonio e hidróxido de sodio) para la separación de las fracciones pécticas, y varían en cuanto a la concentración de los dos últimos, tiempo y facilidad de operación.

Las técnicas de uso más común son las desarrolladas por

Rouse, A.H. y Atkins, C.D. y la de Shewfelt, A.L., et al. dadas las propiedades favorables que presentan al aplicarse sobre diversos frutos.

### 1.3. CLASIFICACION DE LAS PECTINAS CON BASE A SU SOLUBILIDAD.

Las sustancias pécticas se dividen con base a su solubilidad en tres grupos: en agua, oxalato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4]$  y en hidróxido de sodio ó en ácido.

Las pectinas se expresan como ácido anhidrogalacturónico (AGA) en gramos por cien gramos de concentrado, y como porcentaje de pectinas totales solubles en cada uno de los tres disolventes de extracción (33 y 54)

La fracción soluble en agua incluye pectina y aquellos ácidos pectínicos coloidales de elevado contenido en éster metílico, que se localizan en la fase líquida de un alimento y contribuyen a la consistencia y viscosidad serosa. Además, actúan como estabilizantes coloidales y juegan un papel importante en la prevención de asentamiento ó floculación de la fase sólida dispersa en jugos de cítricos (12) En presencia de ciertos iones, especialmente cationes polivalentes como el calcio, los ácidos pectínicos con un contenido en metoxilos menor de 7%, son completamente insolubles en agua (33)

El ácido péctico es esencialmente libre de grupos metil éster, es insoluble en agua lo cual se debe a la presencia de electrolitos. El ácido pectínico también está compuesto de unidades de ácido poligalacturónico y contiene más de una porción insignificante de grupos metoxilo. Generalmente la solubilidad en agua es proporcional a un aumento en la proporción de metil éster (12)

Las sustancias pécticas solubles en oxalato de amonio, incluyen ácido péctico y sus sales además de ácidos pectínicos coloidales de suficiente contenido metil éster bajo para ser insolubles en agua. Estos ácidos al combinarse con cationes polivalentes como el calcio y magnesio forman los pectatos y pectinatos correspondientes formando geles ó precipitados. El oxalato posee un efecto secuestrante en los iones calcio y magnesio. Los ácidos pectínicos son tanto más solubles en agua cuanto más esterificados se hallan. (Cuando poseen menos del siete por ciento de metoxilos se disuelven con dificultad ó son prácticamente insolubles) (4, 33,34)

La tercer categoría, la protopectina es soluble en ácido caliente ó álcalis. La química de esta clase de pectinas se entiende poco debido a que una extracción intensa altera tanto el peso molecular como el grado de esterificación. La insolubilidad de la protopectina en el tejido es el resultado de la unión con celulosas y otros constituyentes de la pared celular (2) La protopectina también se conoce como la sustancia péctica insoluble en agua que por hidrólisis ácida da pectina. Bajo almacenamiento prolongado, la hidrólisis de la protopectina es lenta y puede ocasionar un aumento en el contenido de pectina soluble en agua. La protopectina puede actuar como agente ligante de agua y así contribuir a la consistencia (12,14)

Cuando se desea determinar pectinas totales se usa hidróxido de sodio como el extractante para rendir no sólo protopectina sino también pectatos insolubles en agua y pectinatos solubles simultáneamente (33y34).

#### 1.4 NOMENCLATURA. DESIGNACION DE LAS SUSTANCIAS PECTICAS.

La pectina no se encuentra siempre en la naturaleza como tal, sino que proviene de otra sustancia más compleja, - que es la protopectina, la cual a su vez dá lugar a la formación de otras sustancias como los ácidos pécticos, los pectatos, etc. (14) Debido a esto y a las confusiones creadas al mencionarlas se hizo necesario el establecer una nomenclatura que definiera científicamente a todas estas sustancias y a las enzimas que tienen relación con ellas (28)

En 1927 un comité de la American Chemical Society estableció una terminología para las sustancias pécticas, revisada y adaptada oficialmente en 1944. Dichas definiciones son las que se exponen a continuación y además son empleadas en el desarrollo del presente trabajo:

Sustancias pécticas.- Se denomina sustancias pécticas a aquellos hidratos de carbono coloidales complejos que se encuentran ó son sintetizados a partir de plantas y que contienen una gran proporción de unidades de ácido anhidrogalacturónico unidas por enlaces glicosídicos. Los grupos carboxilo de los ácidos poligalacturónicos pueden estar parcialmente esterificados por grupos metilo y parcial ó completamente neutralizados por una ó más bases.

Protopectina (Pectosa, Pectinógeno).- Sustancia péctica insoluble en agua que se encuentra en las plantas y que por hidrólisis restringida se obtiene pectina ó ácidos pectínicos. Se le denomina también "pectina nativa" y está constituida por una red de cadenas de pectina con iones metálicos en los grupos carboxilo (-COOH), no esterificados (37)

Acidos Pectínicos.- Este término se usa para designar a los -



Ácidos poligalacturónicos (ácidos pécticos) que contienen por lo menos una proporción insignificante de grupos carboxilo esterificados por el metilo. Los ácidos pectínicos bajo condiciones favorables son capaces de formar geles con azúcar y ácido ó si el contenido de metoxilo es bajo, con ciertos iones metálicos. Las sales de los ácidos pectínicos son pectinatos ácidos ó neutros. Los ácidos pectínicos se consideran como pectina de bajo contenido en metoxilo (7-8%).

En esta nomenclatura no existe el ácido pectínico con todos sus grupos carboxilo esterificados (compuesto que no sería un ácido). Dicho ácido pectínico contendría 16.3% de metoxilo (13)

Pectina .- El término general "pectina" (ó pectinas), designa a aquellos ácidos pectínicos solubles en agua de contenido variable en ésteres metálicos y grado de neutralización, capaces de formar geles bajo condiciones adecuadas en presencia de azúcar y ácido.

La expresión "soluble en agua", no debe ser tomada en el sentido estricto de la palabra, ya que las pectinas son incapaces de formar verdaderas soluciones con el agua (1)

Acido Péctico .- Nombre que se da a aquellas sustancias pécticas compuestas en su mayor parte de ácidos poligalacturónicos coloidales y esencialmente libres de grupos éster metálicos. Las sales de los ácidos pectínicos suelen ser normales ó ácidas.

Pectinas Paucimetoxiladas.- Son ácidos pectínicos con un porcentaje de 3 a 7 de metoxilo, en contraste con la cantidad de 7-12% que contienen las pectinas usuales. Se preparan con las pectinas de elevado contenido de éster por desesterificación parcial y son capaces de formar geles en presencia de iones -

metálicos polivalentes.

En la actualidad han adquirido considerable importancia debido a las propiedades que presentan (16)

Todas las denominaciones restantes quedan incluidas dentro de la clasificación de "sustancias pécticas".

En el lenguaje común, el vocablo pectina designa a las pectinas comerciales con sus impurezas y las sustancias que se les añaden para mejorar las propiedades útiles de estos materiales. Los aditivos más comunes son los azúcares como diluyentes y los citratos como reguladores del pH (16)

En la Figura No. 7 se esquematiza la nomenclatura y contenido en metoxilos de las sustancias pécticas.

•  
Protopectinasa (Pectosinasa).- Enzima péctica que actúa como biocatalizador transformando la protopectina (insoluble en agua) en ácidos pectínicos solubles en agua macerando el tejido de plantas.

Pectinesterasa (P.E.).- Enzima desesterificante que se caracteriza por hidrolizar los grupos metil-éster de las moléculas de pectina, produciendo pectina poco metoxilada, ácido péctico y metanol. Esta enzima se conoce también como: Pectin-metil-esterasa y Pectin-hidrolasa.

Poligalacturonasa (P.G.).- Nombre que designa la enzima depolimerizante que rompe enlaces glucosídicos  $\alpha$  D(1 $\rightarrow$ 4) de residuos galacturónicos desesterificados en sustancias pécticas. También es llamada: Pectinasa y Pectin-glicosidasa.

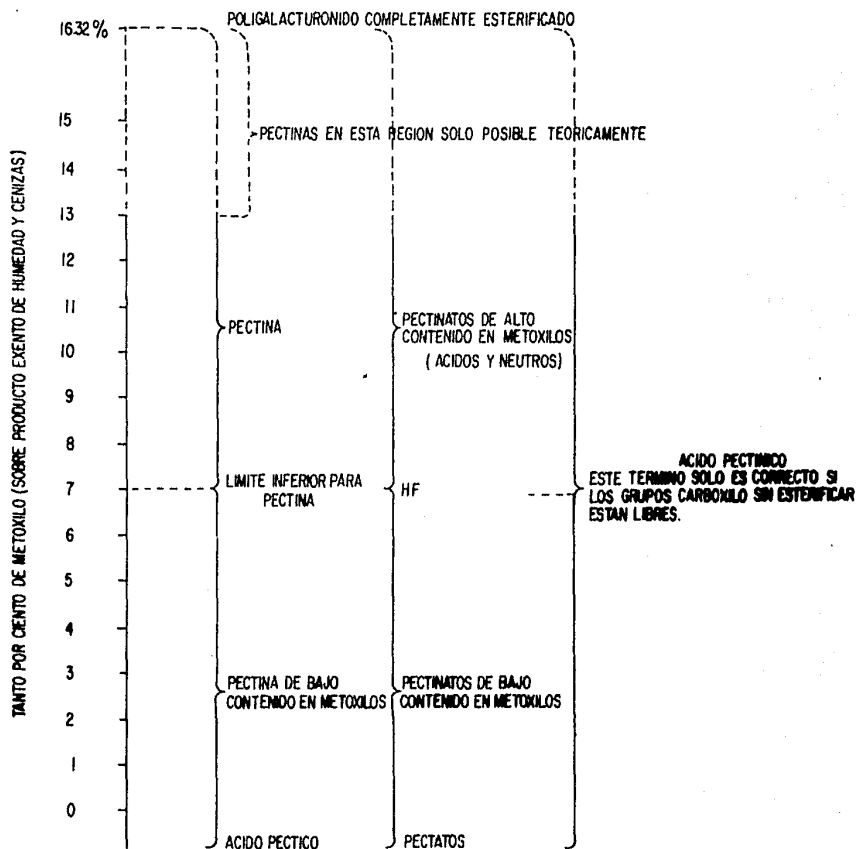


Fig. 7 NOMENCLATURA Y CONTENIDO EN METOXILOS DE LAS SUSTANCIAS PECTICAS. FUENTE: ROYO, I. J. (37)

## 1.5 ESTADO NATURAL Y FUNCION DE LOS COMPUESTOS PECTICOS EN LAS PLANTAS.

Los polisacáridos pécticos son los componentes mayores de las paredes y tejidos celulares primarios y de la laminilla media de tejidos jóvenes en crecimiento, pero ausentes de las paredes celulares de tejidos más maduros (7)

El desarrollo de las sustancias pécticas parece ocurrir cuando los núcleos comienzan a dividirse. La membrana que contiene pectina, divide la célula en dos partes y conforme la división continúa se forman membranas celulósicas con sustancias pécticas en la laminilla media. (28)

Las sustancias pécticas presentes en la pared celular difieren de las de la laminilla media en solubilidad y propiedades histoquímicas. La cantidad y composición de las sustancias pécticas obtenidas de una muestra de tejido particular varía con:

- (a) El origen del espécimen (especies y variedad de plantas).
- (b) Tipo de tejido.
- (c) Condiciones climáticas bajo las que creció.
- (d) La etapa de madurez a la que se cosechó.
- (e) Los métodos usados en la preparación del tejido. (El cuidado en la prevención de cambios fisiológicos post-cosecha, el grado en que la actividad microbiológica y enzimática se inhiben y la naturaleza del tratamiento preliminar)
- (f) El método de extracción (proporción relativa y el tipo de disolvente usado, pH, temperatura y tipo de tratamiento)
- (g) Los métodos usados en la separación de pectinas extraídas de otros materiales solubles.
- (h) El tipo y grado de purificación seguido antes del análisis
- (i) Los procedimientos analíticos usados en ensayo y caracterización. (15)

Una función posible para pectina en la región de la lamina media es mantener la cohesión del tejido actuando como una sustancia adhesiva intercelular. (7) Algunos científicos opinan que el pectato de calcio sirve como cemento para las plantas celulares (basado en el comportamiento de las sustancias pécticas 'in vitro'), sin embargo, los agentes complejantes como: oxalato, hexametáfosfato de sodio y EDTA licúan los geles de pectato de calcio y promueven la desintegración del tejido de frutas y algunos vegetales. Por otro lado, Joslyn (1962) y Doesburg (1965) sumaron los puntos salientes de la insolubilidad de la pectina para explicar la firmeza y cambios en frutas y vegetales:

- (1) Enlaces covalentes de sustancias pécticas a los constituyentes celulares especialmente hemicelulosas y la asociación con otros componentes celulares con enlaces secundarios.
- (2) La presencia de cationes, especialmente  $\text{Ca}^{+2}$ , conduciendo a la insolubilidad de las sustancias pécticas y la reducción de sustancias pécticas muy esterificadas.
- (3) Los enlaces mecánicos de macromoléculas filamentosas de sustancias pécticas y con otros polímeros de la pared celular. (28)

Al ser un excelente coloide, la pectina tiene la propiedad de embeber grandes cantidades de agua y desempeña un papel importante en las primeras etapas del desarrollo del fruto, cuando las células permanecen apartadas y a una distancia comparativamente grande de los vasos que conducen el agua, las sustancias pécticas absorben entonces rápidamente el agua y la transportan entre las células con más facilidad que si hubieran actuado las propiedades osmóticas de las mismas células. (8 y 44)

Para expresar el contenido de pectina de una determinada-

especie ó variedad de fruta, se enuncian las proporciones máximas y mínimas dentro de cuyo margen quedan comprendidos los valores que en condiciones normales se hallarán en las determinaciones cuantitativas efectuadas sobre dichos frutos.

El cuadro No. 1 muestra el contenido de sustancias pécticas promedio de algunas frutas.

**CUADRO No. 1**      CONTENIDO MAXIMO Y MINIMO EN SUSTANCIAS  
PECTICAS DE ALGUNOS FRUTOS.

FRUTO	SUSTANCIAS PECTICAS (%) <sup>a</sup>
Manzana (Albedo+Flavedo)	0.5 - 2.2
Subproducto de Naranja	1.5 - 4.0
Toronja (Albedo+Flavedo)	3.0 - 4.5
Subproducto de Toronja	2.5 - 4.5
Albaricoque (Pulpa)	0.7 - 1.5
Cereza (Pulpa)	0.2 - 0.5
Limon (Albedo+Flavedo)	2.0 - 5.5
Melocotón (Pulpa)	0.5 - 3.9
Pera	0.4 - 0.7
Ciruela (Pulpa)	0.7 - 1.1
Tomate	0.1 - 0.5

a : % En peso fresco.

FUENTE: Mc. Cready, R.M. (28); Pantástico, E.B. (29) y  
Royo, I.J. (37).

Los valores fuera de los mostrados pueden ocurrir de - bido a los cambios que sufren las sustancias pécticas du - rante la maduración y crecimiento de frutas y vegetales.

Como materia prima para fabricar pectinas sólo han alcanzado importancia comercial el bagazo de manzana y cáscara de cítricos. (15 y 26)

La cáscara de cítricos está compuesta de flavedo ó epicarpio y albedo ó mesocarpio. El flavedo es la porción externa de la cáscara y se compone de seis pigmentos carotenoides, ácido ascórbico, complejo vitamínico B (bajo contenido) y - aceites esenciales. El albedo, porción interna esponjosa de la cáscara está compuesta principalmente de celulosas, carbohidratos solubles y sustancias pécticas, flavonoides, amino - ácidos y vitaminas. (18)

La pulpa de frutos como el mango, se divide en segmentos (carpelos) y cada segmento está compuesto de cientos de ve - sículas ó sacos de jugo impermeables. Las vesículas están - compuestas de celulosa, hemicelulosa, protopectina, pectina, azúcares, flavonoides, aminoácidos, vitamina C, sales minerales y otros nutrientes. (48)

En la industria, el fin que se pretende es la obtención de productos de máximo valor comercial con mínimo costo; las pectinas aisladas no son del grado más alto obtenible, ni se intenta extraer toda la pectina en ellas existente. (47)



## CAPÍTULO II

### METODOLOGIA EXPERIMENTAL

## 2.1 PREPARACION DE MATERIA PRIMA.

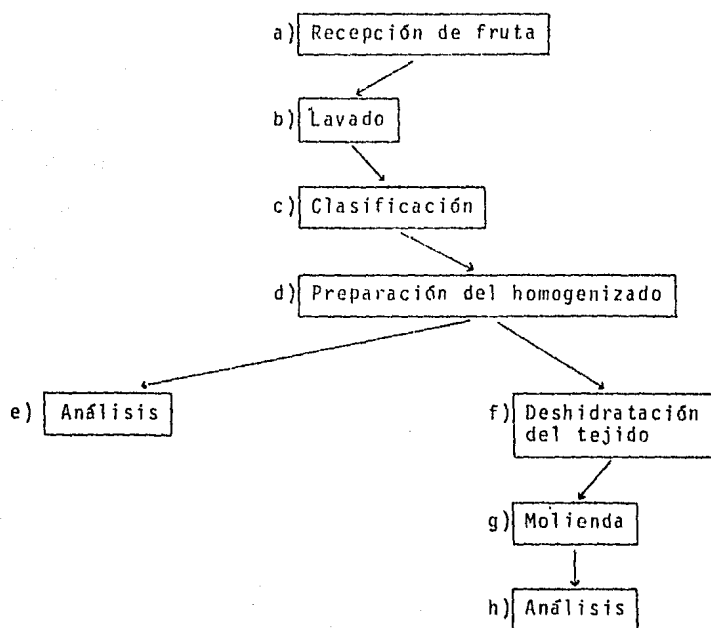
A continuación se describe la metodología a seguir en este trabajo.

- (a) Recepción. Se recibe la fruta: Naranja Valencia (estado maduro) y Mango Kent (estado maduro).
- (b) Lavado. La fruta recolectada se lava bien con agua corriente para la eliminación de materiales extraños.
- (c) Clasificación. La fruta se clasifica con base a su estado de madurez (apariciencia general externa): color, forma, peso promedio y textura). Eliminándose aquellas que presenten evidencia de enfermedad, daños mecánicos, ataque de insectos y otras alteraciones.
- (d) Preparación del Homogenizado. Se parte de fruta fresca la cual se homogeniza con el fin de obtener una composición uniforme.
- (e) Análisis. Se toma una pequeña porción del homogenizado para su análisis y determinación del índice de madurez. El análisis incluye las siguientes determinaciones:
  - 1- Sólidos solubles( ° Brix )
  - 2- Acidez titulable( % de Acido cítrico )
  - 3- Humedad del tejido.
- (f) Deshidratación del tejido. Esta se hace con el fin de disminuir al máximo las posibles alteraciones y cambios en composición que sufre el material fresco. Esta operación se hace en estufa de vacío a 50°C aprox. hasta obtener peso constante.
- (g) Molienda. El tejido desecado se tritura hasta obtener un polvo fino y así facilitar su análisis posterior.

(h) Análisis. El polvo se utiliza para la extracción de los Sólidos Insolubles en Alcohol (SIA) presentes en la muestra para la determinación de las sustancias pécticas.

El diagrama para la preparación de la materia prima se muestra en la Figura No. 8

FIG. No. 8 DIAGRAMA PARA LA PREPARACION DE LA MATERIA PRIMA.



## 2.2 MATERIALES Y EQUIPO.

Se utilizó como materia prima Naranja Valencia (cáscara) y Mango Kent (pulpa) en estado maduro.

El material de vidrio usado fué el común de laboratorio.

El equipo que se utilizó fué el siguiente:

- Agitador tipo Waring Blendor con jarras de acero inoxidable de 1 lt. de capacidad.
- Balanza analítica "Sauter", modelo 414.
- Baño de vapor "Lab Line Instruments", modelo 3000.
- Bomba de vacío "Koblenz", modelo CGP 134.
- Centrífuga "Damon IEC Division", modelo 460 G.
- Espectrofotómetro "PYE UNICAM", modelo SP 1800, equipada con celdas rectangulares de 10 y 40 mm.
- Estufa de vacío "Thelco", modelo 19.
- Agitador mecánico "Burrel", modelo 75.
- Refractómetro "Carlzeiss", modelo 713589 de escala 0-30 °Brix.

### Reactivos.

- Alcohol etílico 99.8%
- Alcohol etílico purificado. Refluidar 1 lt. de alcohol etílico grado reactivo (95%) con 4 g. de polvo de zinc y 2 ml. de ácido sulfúrico concentrado durante 24 hr. Destilar usando material de vidrio, redestilar del polvo de zinc e hidróxido de potasio usando 4 g. de cada uno para un litro de alcohol.
- Acetona 99.5%.
- Oxalato de amonio. Solución 0.75%
- Hidróxido de sodio. Solución 1 N.
- Acido sulfúrico concentrado.

Deshechar aquellos lotes de ácido que den color al adicionarse a la solución de carbazol.

- Carbazol. Solución alcohólica 0.1%  
Disolver 0.1 g. del carbazol grado reactivo en alcohol-etílico puro y diluir a 100 ml. El blanco de 1 ml. de agua, 0.5 ml. de solución de carbazol 0.1% y 6 ml. de ácido sulfúrico debe ser blanco-transparente.
- Acido D-galacturónico monohidratado.
- Pectina cítrica comercial (grado alimenticio).

### 2.3 METODOLOGIA.

(a) Técnicas Analíticas para la Determinación del Estado de Madurez en las Frutas.

Se realizó el análisis químico en base a las siguientes determinaciones:

- a.1) Humedad (Método 31.006 AOAC) (2). Se refiere al contenido global de agua en el fruto.
- a.2) Acidez titulable (Método 22.060 AOAC). La acidez se determinó por neutralización con NaOH 0.1 N usando como indicador fenolftaleína y los resultados se expresaron en tanto por ciento de ácido cítrico. (2)
- a.3) Sólidos solubles (Método 22.024 AOAC). El porcentaje de los sólidos solubles, que son principalmente azúcares, se expresó en ° Brix, medidos por medio de un refractómetro. (2)
- a.4) Índice de madurez. Se procedió a conocer el índice de madurez al dividir los grados Brix por el tanto por ciento de ácido cítrico correspondiente a los frutos en cuestión.

b) Extracción de Sólidos Insolubles en Alcohol. (SIA).

Es necesaria la separación de una fracción soluble en alcohol y otra insoluble para facilitar la determinación de los compuestos pécticos presentes en el tejido. Dicha separación se llevó a cabo de la siguiente manera:

La fracción de sólidos insolubles en etanol se preparó y determinó mezclando 50g. de tejido seco con 600 ml. de alcohol etílico al 95%, seguido de calentamiento en baño de vapor a ebullición lenta durante 20 minutos y se enfrió rápidamente a temperatura ambiente.

Posteriormente la mezcla se filtró al vacío a través de papel Whatman No. 4. El residuo se secó durante una noche a 48 °C, se pesó y se pulverizó. Este residuo seco se utilizó en la determinación de la constitución péctica. (45y16)

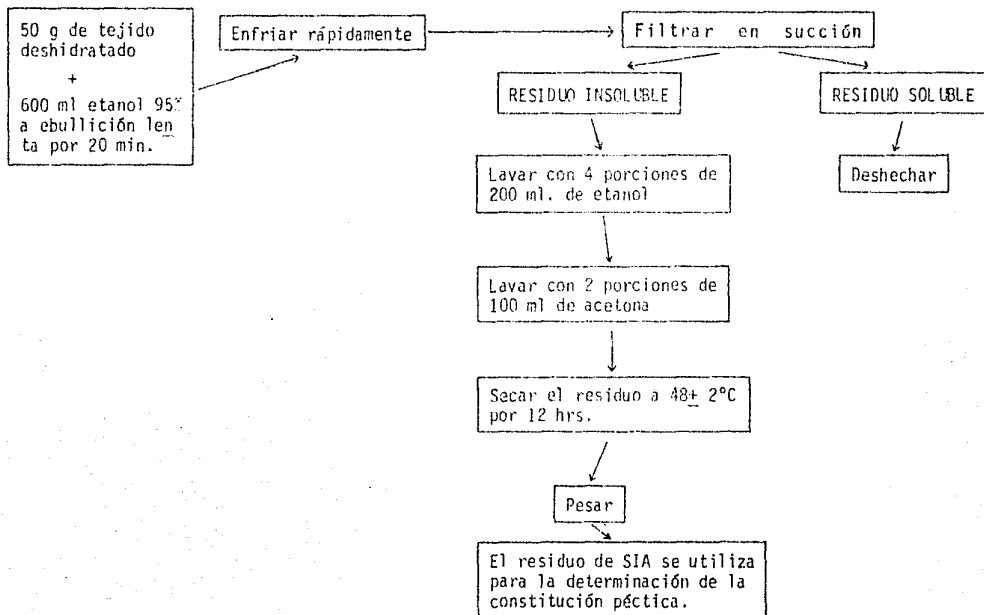
La Figura No. 9 muestra el procedimiento descrito para la preparación de SIA.

c) Determinación de Fracciones Pécticas.

Este estudio se enfocó hacia la modificación de la técnica de Rouse y Atkins (por las razones expuestas en la página 18). la cual se describe a continuación:

La pectina soluble en agua se determinó (con un mínimo de cinco repeticiones) de una muestra de 0.25 g de SIA que se colocaron en tubos de centrífuga de 250 ml. (separados). Después de humedecer cada muestra con alcohol etílico, se añadieron 100 ml. de agua destilada a temperatura ambiente, se agitaron vigorosamente en un agitador mecánico durante 15 min. y se centrifugaron a 2300 rpm. por 10 min., se filtraron y los líquidos se transfirieron a matraces volumétricos de -

FIG. No. 9 DIAGRAMA PARA LA PREPARACION DE SIA.





500ml. La extracción con agua se repitió tres veces más y los extractos acuosos se transfirieron a los matraces respectivos. Se les adicionaron 5 ml. de hidróxido de sodio 1N a cada extracto acuoso, se aforaron y mezclaron antes de cuantificar colorimétricamente.

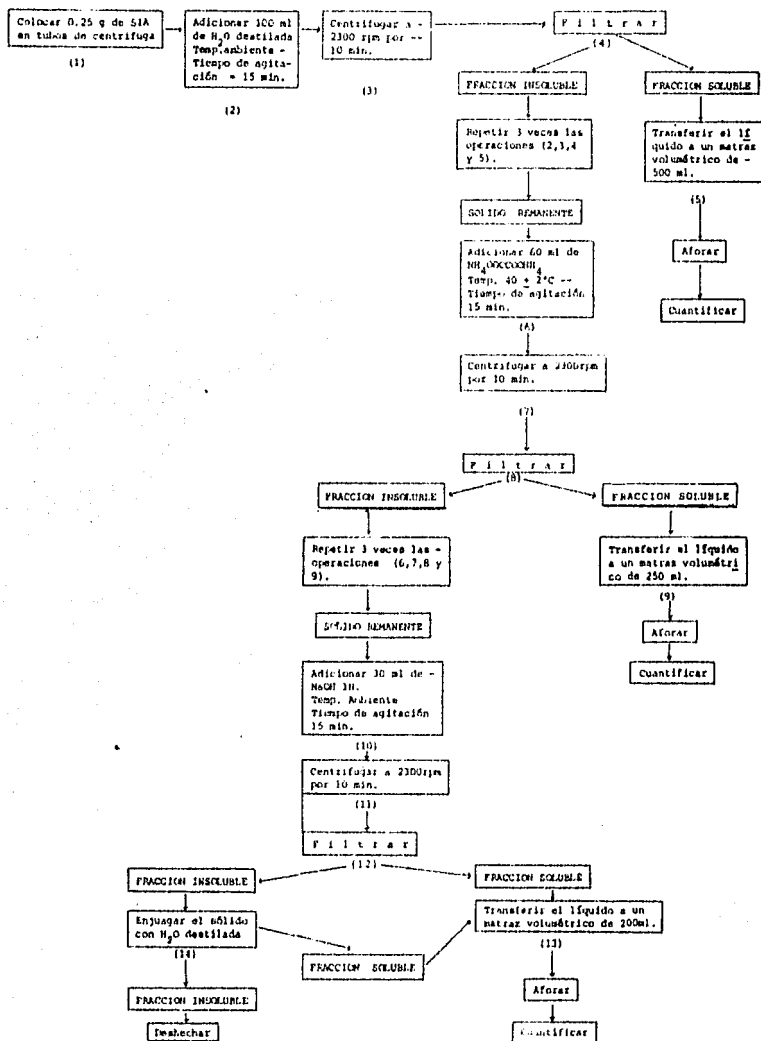
A los residuos en los tubos de centrífuga se les adicionaron 600 ml. de oxalato de amonio 0.75% a una temperatura de  $40 \pm 2$  °C, se mezclaron vigorosa y continuamente por 15 min., se centrifugaron a 2500 rpm, se filtraron\* y se transfirieron a matraces volumétricos de 250 ml. La extracción con la solución de oxalato de amonio se repitió tres veces más, los extractos se pasaron a los matraces correspondientes, se les añadieron 5 ml. de hidróxido de sodio 1N a cada uno de los extractos. Se diluyeron a volúmen y se mezclaron antes de proceder a la cuantificación colorimétrica.

Se añadieron 50 ml. de hidróxido de sodio 1N a temperatura ambiente a cada uno de los residuos remanentes en los tubos de centrífuga, se agitaron durante 15 min., se filtraron\* y los líquidos se transfirieron a matraces volumétricos de 200 ml. Los residuos se enjuagaron con 100 ml. de agua destilada a temperatura ambiente y se mezclaron con sus disoluciones respectivas. Se aforaron y se cuantificaron colorimétricamente.

\* La operación de filtrado se realizó con tela de tul de poro de 0.062 mm. para las muestras de cáscara de naranja y para las de pulpa de mango se usó panel filtro Whatman No. 4.

El diagrama del proceso para la extracción de compuestos pécticos se presenta en la Figura No. 10.

FIG. No. 10 DIAGRAMA PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS  
PLÉTICOS A PARTIR DE SIA.



d) Método Colorimétrico para la Cuantificación de Sustancias Péclicas.

Para la determinación cuantitativa se usó el método colorimétrico de Dische por su especificidad y precisión (24), - basado en la reacción del ácido galacturónico (unidad estructural básica de la molécula de pectina) con el carbazol en - presencia de ácido sulfúrico y la medida del color a 525 nm.

Se pipeteó 1 ml. de alícuota de cada extracto pectínico y 0.5 ml. de la solución alcohólica del carbazol 0.1% en un tubo de ensayo y 0.5 ml. de alcohol etílico puro al blanco. - En los tubos de muestra se formó un precipitado blanco flocculento, se adicionaron 6 ml. de ácido sulfúrico concentrado - con agitación constante durante 6 seg. usando una bureta - para obtener una temperatura de 85°C (color de la solución). Los tubos se colocaron inmediatamente en baño de agua a 85°C. (de otra manera se producirían intensidades variables de rojo en las muestras). Los tubos permanecieron en el baño 5 min. - para desarrollar el color. Se dejaron enfriar por 15 min. y - se levó el porcentaje de transmitancia en un espectrofotómetro a 525 nm. después de ajustar el aparato con el blanco. (24,34,44)

Los datos se refirieron a la curva patrón para obtener la concentración de ácido anhidrogacturónico (AGA) en microgramos.

Para calcular el porcentaje de AGA en las muestras, se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AGA} = \frac{\text{g. AGA} \times \text{vol. de dilución} \times 100}{1,000,000 \times \text{peso de muestra (g.)}}$$

Los resultados se expresaron como:

- (a) El porcentaje de AGA presente en SIA.
  - (b) El porcentaje de AGA presente en el tejido.
- e) Preparación de la Curva Patrón con AGA.

Se pesaron exactamente 120.5 mg. de ácido galacturónico monohidratado, previamente secado al vacío durante 5 hrs. a 30°C ó secado sobre pentóxido de fósforo a temperatura ambiente y se transfirió a un matraz volumétrico de 1 lt., al cual se le añadieron 0.5 ml. de hidróxido de sodio 1 N y se aforó con agua destilada. La solución se agitó y se dejó en reposo durante toda la noche.

Esta solución patrón contenía 100  $\mu$ g. de AGA por ml. La razón del peso molecular del AGA a ácido galacturónico monohidratado es 176/212.

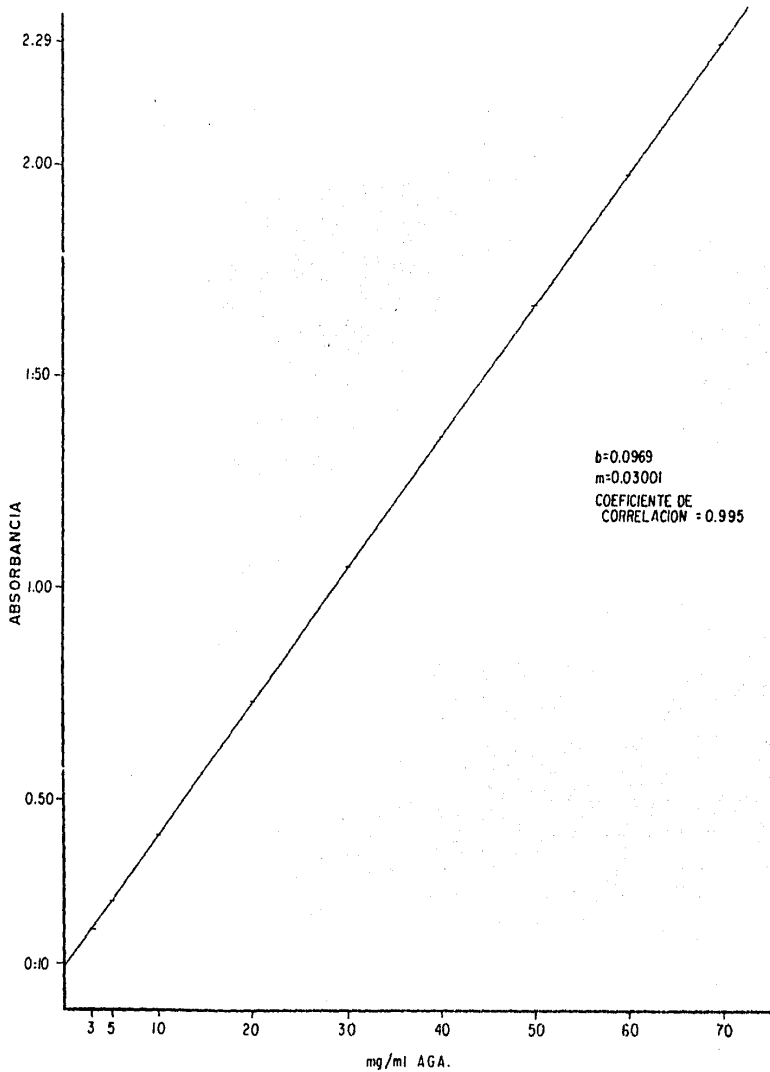
Se prepararon las soluciones para la curva patrón que cubrieron el rango de 5 a 70  $\mu$ g. de AGA por ml.

Se desarrolló el color de los estándares como se describió para el extracto de muestra usando alícuotas de 1 ml. para cada dilución y se leyó la absorbancia a 525 nm. en el espectrofotómetro. (34,44)

Para la curva patrón se graficó la absorbancia contra la concentración de AGA en  $\mu$ g/ml. (Ver Figura No. 11)

## CURVA PATRON PARA DETERMINAR EL % DE ACIDO ANHIDRURONICO EN PECTINA

42



## f) Evaluación Estadística de los Resultados.

Los resultados obtenidos para cada fracción de compuestos pécticos fueron analizados estadísticamente a través del cálculo de la "t de Student" con el fin de comparar dos conjuntos de datos (correspondientes a días diferentes) para determinar así el nivel de significancia entre ellos y los límites de confianza correspondientes.

Las hipótesis planteadas para este diseño experimental son las siguientes:

1.- La media poblacional del primer conjunto de datos es igual a la media poblacional del segundo conjunto de datos y no hay diferencia esencial entre los grupos.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

2.- Las medias poblacionales de los dos conjuntos de datos son diferentes y existe diferencia entre los grupos.

$$H_1 \neq \mu_1 \neq \mu_2$$

Se calculó "t" para la comparación de las dos medias, utilizando la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{Sc \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

En donde:

$S_c$  = Desviación estándar de los dos grupos.

$$S_c = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$\bar{X}_1$  y  $\bar{X}_2$  = medias poblacionales de cada conjunto de datos.

$n_1$  y  $n_2$  = número de repeticiones de cada conjunto de datos.

Se comparan la  $t$  calculada y los valores del cuadro de distribución de  $t$  para los grados de libertad correspondientes para establecer los niveles de significancia, de tal manera que se puede aceptar ó rechazar una de las hipótesis planteadas de acuerdo al siguiente criterio:

Si la  $t$  calculada es menor que el valor de  $t$  reportado en tablas de distribución de  $t$ , se acepta  $H_0$  y se concluye que no existen diferencias entre las muestras a un nivel de significancia determinado (las diferencias son de una magnitud prácticamente despreciable). (11 y 17)

Es decir,

$$\text{Si } t_c < t_t \text{ (g.l.} = n_1 + n_2 - 2), \text{ se acepta } H_0$$

Por el contrario, si la  $t$  calculada es mayor que la  $t$  reportada en las tablas,  $H_0$  se rechaza y se concluye que existe diferencia significativa entre los grupos de datos:

Es decir,

$$\text{Si } t_c > t_t \text{ (g.l.} = n_1 + n_2 - 2), \text{ se rechaza } H_0$$

Una vez comparada  $t$  calculada con  $t$  de tablas para g.l. =  $n_1 + n_2 - 2$ , se conoce el nivel de significancia (ó con que porcentaje de confianza no existe diferencia), útil para el cálculo de los límites de confianza para cada conjunto de datos con la fórmula siguiente:

$$X_1 = S [t_t \text{ para } (n_1 + n_2 - 2 = \text{g.l.})] / \sqrt{n}$$

En donde:

$\bar{X}_1$  = Media Poblacional del Primer Conjunto de Datos.

$S$  = Desviación Estándar.

$t_t$  =  $t$  de Tablas para  $X$  Nivel de Significancia.

$n$  = Número de Datos.

El método de la "t de Student" se puede sustituir por un método más rápido, aproximado que es útil cuando se desconoce la desviación estándar y el número de datos de cada grupo es el mismo.

Se calcula  $Td$  mediante la siguiente fórmula:

$$Td = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\frac{1}{2} (A_1 + A_2)}$$

Donde:

$\bar{X}$  = Media Poblacional.

$A$  = Amplitud del Conjunto de Datos.

Y el valor obtenido se compara con el valor de  $P$  reportado en tablas para el nivel de significancia dado y g.l. =  $n_1 + n_2 - 2$ . Las hipótesis planteadas para este diseño son las mismas que para  $t$  de Student. Se sigue el mismo -



criterio para el rechazo ó aceptación de las hipótesis planteadas.

Generalmente tanto la prueba de "t de Student" como el método aproximado dan las mismas conclusiones.

Para saber la amplitud que debe tener una diferencia para alcanzar el nivel de significación dado se calcula DSM - (Diferencia Significativa Mínima) con la fórmula:

$$DSM = t (Sc) \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

Donde:

t = t de Tablas para un Nivel de Significancia Dado.

$$Sc = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

S = Desviación Estándar.

n = Número de Datos de cada Conjunto.

Y dá el valor de la diferencia que es apenas significativa en el nivel de probabilidad deseado. (11)

**RESULTADOS Y DISCUSION**

De las técnicas disponibles para la extracción de compuestos péclicos, se eligieron la desarrollada por Shewfelt et al., (46) y la elaborada por Rouse y Atkins (34) (Las cuales se describen en los apéndices 1 y 2 respectivamente), con el fin de comparar la influencia del conjunto de diversos factores como volumen, tipo y concentración de disolventes en la extracción de sustancias péclicas; en ambos casos, dichos compuestos se cuantificaron por el método colorimétrico de la reacción del carbazol de Dische (24).

Se observó que la técnica de Shewfelt, et al., requiere de:

- a) Mayor cantidad de muestra.
- b) Mayor volumen de disolventes necesarios para la extracción.
- c) Mayor tiempo de operación.
- d) Mayor manipulación y manejo, ejerciendo influencia directa en la recuperación.

Además, en dicha técnica es necesario concentrar la disolución de pectina a  $\frac{1}{3}$  de su volumen (bajo presión reducida a una temperatura de 50°C), en la práctica de tal operación la temperatura utilizada debía ser mayor de 50°C para poder concentrar agua (operación demasiado lenta) lo que trajo como consecuencia pérdida en el poder de gelificación de los compuestos péclicos al precipitarlos con etanol (varias horas de reposo) y por lo tanto, menor rendimiento en la cuantificación de dichos compuestos (38).

Para fines prácticos, este estudio se enfocó hacia la modificación de la técnica de Rouse y Atkins por las razones expuestas anteriormente. En dicha técnica se substituyó la ex

tracción de SIA, por la usada en la técnica de Shewfelt, (45) porque demostró ser más eficiente al usar como materia prima frutos de elevado contenido péctico y se seleccionaron las condiciones de extracción que influyen en la recuperación de tales compuestos modificando una variable, manteniendo las demás condiciones de operación constantes para facilitar su extracción y obtener mayor recuperación de las sustancias pécticas.

Dichas condiciones son las siguientes:

- a) Tamaño de muestra.
- b) Volumen de extracción.
- c) Concentración de agente secuestrante.
- d) Temperatura de los disolventes.
- e) Tiempo de agitación.

a) Tamaño de Muestra.  
 - - - - -

Las pruebas se realizaron por duplicado, usando 0.25g, - 0.50g y 0.75g de SIA manteniendo las demás variables constantes. (Cuadro No. 2).

Los resultados de dicho cuadro muestran que al usar 0.25g de SIA se incrementó el rendimiento de pectinas (como % AGA), además de facilitar el manejo durante la operación. Los valores obtenidos fueron diferentes a los reportados en la bibliografía citada (por los factores descritos en la pág. 25). Para asegurar una mayor extracción de los compuestos pécticos fué necesario ajustar las condiciones citadas anteriormente.

CUADRO No. 2 TAMAÑO DE MUESTRA

Peso (g SIA)	S o l u b l e c n :							
	Cáscara	H <sub>2</sub> O <sup>*</sup> SIA	NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> Cáscara	0.75% <sup>*</sup> SIA	NaOH IN <sup>*</sup> Cáscara	SIA	Totales <sup>*</sup>	
							Cáscara	SIA
0.25	7.513	11.232	4.710	7.058	5.239	7.833	17.463	26.103
	6.865	10.262	4.401	6.577	5.163	7.719	16.430	24.558
0.50	5.362	8.021	3.106	4.644	0.991	1.481	12.460	14.146
	6.120	9.155	4.426	6.615	0.721	1.078	11.267	16.848
0.75	5.720	8.561	3.849	5.755	1.075	1.607	10.645	15.923
	6.089	9.113	3.401	5.084	0.956	1.428	10.447	15.625

\* % de Pectina como AGA (peso seco).

Una vez obtenidos estos resultados, se trabajó directamente sobre la modificación del proceso de extracción, desarrollando paso a paso para encontrar las mejores condiciones de operación.

(1) En la técnica original se usa como materia prima jugo de cítricos (16g. peso fresco) ó concentrado (4g. peso fresco) que contienen menor cantidad de sustancias péclicas que la cáscara de naranja (peso seco para facilitar su manejo), por lo que es importante conocer la cantidad aproximada de pectina que se extrae de dicha cáscara ya que de ésto depende el rendimiento de la operación. Se hicieron las correcciones a dicha técnica considerando que:

100g. de jugo concentrado contienen 0.429g. de pectina totales

4g. de jugo concentrado \_\_\_\_\_ X

X = 0.0171g. de pectina totales.

Por lo tanto, la técnica se usa sin modificaciones para la extracción de 0.0171 g. de pectina.

(2) Para extraer las sustancias pécticas presentes en 1g. de SIA (peso seco), se necesitan 500 ml. de agua destilada, 500 ml. de oxalato de amonio 0.75% y 225 ml. de NaOH 0.05N (31,35).

Se redujo el tamaño de muestra a 0.25g. de SIA con el fin de disminuir el volumen de disolventes necesarios para realizar la extracción. Así, para la extracción de la fracción péctica soluble en agua se requieren 125 ml. de agua destilada (en 2 lavados de 60 ml. c/u), para la segunda fracción -- 125 ml. de oxalato de amonio 0.75% (en 2 lavados de 60 ml. c/u) y para la fracción soluble en hidróxido de sodio se necesitan 57 ml. de NaOH 0.05 N ó 28 ml. de NaOH 1 N (en un lavado).

#### b) Volumen de Extracción.

Con las consideraciones teóricas anteriores, se modificó el volumen de extracción para una muestra de 0.25g. de SIA -- manteniendo constantes las demás variables. (Cuadro No. 3)

En los resultados se observa que la cantidad de pectina soluble en agua se mantuvo más o menos constante, el rendimiento de la fracción soluble en oxalato de amonio se increme

mentó (2.70%) y las pectinas solubles en hidróxido de sodio disminuyeron (1.76%). Estos resultados fueron más confiables porque el volumen de extracción se ajustó para cada caso.

CUADRO No. 3 INFLUENCIA DE LA VARIACION DEL VOLUMEN DE EXTRACCION DE LOS DISOLVENTES ( a Temp.amb.)

S o l u b l e e n :

H <sub>2</sub> O *		Ni <sub>4</sub> OCCCOONH <sub>4</sub> 0.75%		NaOH IN		Totales	
Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA
7.570	11.325	7.539	11.265	3.380	5.059	18.486	27.649
7.600	11.366	7.161	10.707	3.441	5.145	18 201	27.218

V 2 lavados de            2 lavados de            1 lavado de  
 O 60 ml. c/u            60 ml. c/u            28 ml.  
 L

\* % de Pectina como AGA. (peso seco).

### c) Concentración de Oxalato de Amonio.

En el paso siguiente se observó la influencia que ejerce el agente secuestrante (oxalato de amonio), en mayor concentración sobre las sustancias pécticas, manteniendo constantes las demás variables. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro No. 4.

El uso de oxalato de amonio como agente secuestrante de los iones Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> presentes en las moléculas de las sustancias pécticas en concentración elevada (1.5%) ocasionó la formación de oxalato de calcio en cantidad suficiente para ocluir la extracción de sustancias pécticas. Se prefie -

re el oxalato de amonio 0.75% porque se recupera mayor cantidad de estos compuestos.

**CUADRO No. 4** INFLUENCIA DEL INCREMENTO DE CONCENTRACION DEL OXALATO DE AMONIO EN LA RECUPERACION DE SUSTANCIAS PECTICAS. ( a T. amb.)

Cáscara	H <sub>2</sub> O *		NH <sub>4</sub> OOCCOONH <sub>4</sub> 1.5% *		NaOH IN *		Totales *	
	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara
7.600	11.363	5.649	8.401	1.259	1.873	14.509	21.638	
6.721	10.048	5.658	8.445	2.421	3.613	14.801	22.106	
7.363	11.007	4.305	6.459	1.723	2.586	13.392	20.053	

\* % de Pectina como AGA (peso seco).

d) Temperatura.

Al ser la fracción soluble en oxalato de amonio, la que hasta este momento presentó mayor variación, se realizaron pruebas incrementando la temperatura ( $40 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante la extracción, manteniendo constantes las demás variables, tales resultados se muestran en el Cuadro No. 5.

Al aumentar ligeramente la temperatura de la solución de oxalato de amonio 0.75%, la fracción soluble en este compuesto se incrementó, por lo que se trabajó a una temperatura de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ . Como puede observarse existe variación considerable entre los datos que se obtuvieron (2.3%), por lo que se procedió a verificar si el volumen de extracción y el número de lavados fueron suficientes para extraer la mayor cantidad posible de cada fracción y verificar además, si existió translapec de solu-



bilidad entre los compuestos pécticos solubles en la primera y segunda fracción, por lo que se cuantificaron las pectinas que se disolvieron en cada lavado de extracción.

**CUADRO No. 5** INFLUENCIA DEL INCREMENTO DE TEMPERATURA (de 25 a 40<sup>±</sup> 2°C) EN LA EXTRACCION CON - OXALATO DE AMONIO.

S o l u b l e e n :

Cáscara	H <sub>2</sub> O *		NH <sub>4</sub> COCCOONH <sub>4</sub> 0.75% *		NaOH 1N *		Totales*	
	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA
7.097	10.610	7.725	11.454	0.896	1.340	15.716	23.404	
6.483	9.692	8.894	13.297	1.392	2.082	16.770	25.072	
5.561	8.313	8.757	13.060	2.225	3.326	16.523	24.700	
5.771	8.636	9.154	13.684	0.985	1.475	15.917	23.794	
7.530	8.267	9.215	13.775	2.500	3.439	17.046	25.482	

\* % de Pectina como AGA (peso seco).

e) Número de Lavados para la Extracción de Pectina.

En el Cuadro No. 6 están comprendidos los valores correspondientes a la cantidad de sustancias pécticas solubles en cada lavado de la primera y segunda fracción, manteniendo las demás variables constantes.

Se consideró que cuatro lavados de 100 ml. fueron suficientes para la extracción de las sustancias pécticas solubles en agua, ya que el quinto y sexto lavado extrajeron una cantidad considerada irrelevante.

CUADRO No. 6 NUMERO DE LAVADOS PARA LA EXTRACCION DE PECTINA.

S o l u b l e e n :

No. de lavados	Cáscara	H <sub>2</sub> O *		Ni400CCOONH <sub>4</sub> 0.5% *		NaOH 1N *		Totales *	
		Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA
1	2.848	4.258	6.451	9.650	2.580	3.861	11.879	17.770	
2	2.937	4.390	0.941	1.407	0.280	0.419	4.158	6.217	
3	2.309	3.452	0.711	1.063	-	-	3.020	4.516	
4	0.316	0.475	0.250	0.374	-	-	0.566	0.847	
5	0.144	0.215	-	-	-	-	0.144	0.215	
6	0.104	0.155	-	-	-	-	0.104	0.155	
	8.658	12.946	8.355	12.496	2.860	4.280	19.871	29.723	

\* % de Pectina como AGA (peso seco).

Para la extracción de la porción soluble en oxalato de amonio, fueron suficientes 4 lavados de 60 ml. cada uno, y para la soluble en hidróxido de sodio un lavado de 28 ml. fué adecuado, puesto que esta fracción ha mostrado poca variabilidad en su recuperación.

Se comprobó además, que en este caso, la cantidad de pectina solubilizada en la primera fracción, no repercutió en el rendimiento de la segunda y tercera. Asimismo la cantidad de sustancias pécticas extraídas en cada porción disminuyó conforme el número de lavados aumentó.

## f) Tiempo de Agitación.

Una vez determinado el número de lavados necesarios para extraer mayor cantidad de tales compuestos, el siguiente paso fue ver la influencia que ejerce el incremento del tiempo de agitación durante cada lavado (este se modificó de 5 a 15 min.), manteniendo constantes las demás variables. Los resultados se presentan en el Cuadro No. 7.

**CUADRO No. 7** INFLUENCIA DEL INCREMENTO DEL TIEMPO DE AGITACION (de 5 a 15 min.) DURANTE LA EXTRACCION DE PECTINA.

S o l u b l e e n :

No. de lavados	H <sub>2</sub> O*		NH <sub>4</sub> 00CCOONH <sub>4</sub> 0.75%*		NaOH IN*		Totales*	
	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA
1	6.846	10.236	3.912	5.849	1.896	2.830	12.654	18.915
2	4.087	6.110	2.466	3.687	0.316	0.471	6.869	10.268
5	1.693	2.531	1.036	1.549	-	-	2.729	4.080
4	0.970	1.450	0.926	1.385	-	-	1.896	2.835
	13.597	20.329	8.541	12.470	2.212	3.301	24.048	36.098

\* % de Pectina como AGA (peso seco).

Se observó que al incrementar el tiempo de agitación, aumentó el porcentaje de pectina extraíble durante cada lavado y se aseguró que no existe translapo de solubilidad entre las fracciones. Además, la proporción de pectina extraí

da permaneció más o menos constante al haber aumentado el tiempo de agitación.

En el Cuadro No. 8 se comparan las condiciones de operación de la técnica original y las que se obtuvieron durante el desarrollo de este trabajo experimental.

**CUADRO No. 8** COMPARACION DE LA TECNICA DE ROUSE Y ATKINS ORIGINAL CONTRA LA MODIFICADA.

Condiciones	Originales			Modificadas		
	H <sub>2</sub> O	NH <sub>4</sub> COCCOONH <sub>4</sub> 0.75%	NaOH IN	H <sub>2</sub> O	NH <sub>4</sub> COCCOONH <sub>4</sub> 0.75%	NaOH IN
Tamaño de muestra (g)	16g de jugo ó 4g de concentrado			0.25g. SIA.		
	Pectina soluble en:					
Vol. Extracción (ml)	40	40	5	100	60	30
No. Lavados	2	2	1	4	4	1
Temperatura (°C)	Amb.	Amb.	Amb.	Amb.	40 ± 2	Amb.
Tiempo Agitación (min)	10	10	5	15	15	15

PORCENTAJE DE RECUPERACION.

- \* El porcentaje de recuperación de las sustancias pécticas se estableció utilizando la técnica para la extracción de pectinas totales. Se partió de pectina cítrica comercial (grado alimenticio), recuperándose 85% de ésta (promedio de 3 determinaciones).
- \* Se aplicó la técnica estandarizada para la extracción de las sustancias pécticas a una muestra de 0.25g. de SIA - (procedente de cáscara de naranja) adicionada de 0.025g. de pectina comercial y se obtuvieron los siguientes resultados, representados por los dos primeros valores del cuadro No. 9 y los dos últimos sin la adición de pectina.

**CUADRO No. 9.** PORCENTAJE DE RECUPERACION DE PECTINA AL ADICIONARLE PECTINA COMERCIAL EN SIA(T.amb.)

S o l u b l e e n :

	H <sub>2</sub> O*		NH <sub>4</sub> OOC <sup>-</sup> COONH <sub>4</sub> 0.75%*		NaOH IN*		Totales*	
	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA
a	14.348	21.448	6.194	9.258	3.402	5.084	23.945	35.791
	14.242	21.286	7.156	10.667	2.909	4.348	24.288	36.301
b	10.973	16.405	6.170	9.226	3.211	4.798	20.355	30.429
	9.820	14.651	6.050	9.044	3.554	5.343	19.446	29.038

\* % de Pectina como AGA (peso seco).

a Con Adición de Pectina Comercial(0.025g).

b Sin Adición de Pectina Comercial.

Al comparar los datos del cuadro anterior (adicionados de pectina con los no adicionados), se observa que en la primera fracción (pectina soluble en agua), se incrementó su recuperación, mientras que las otras dos fracciones perma necieron más o menos constantes, y presentaron variaciones propias del manejo y de la técnica.

Para saber el porcentaje de recuperación de la técnica en las tres fracciones (sin considerar la oposición -- que presenta el tejido a su extracción), se adicionaron 0.0254 g. de pectina comercial (que corresponde a 0.1651 g. de AGA) y de éstos se recuperaron 0.016 g. de AGA. El porcentaje de recuperación de las sustancias pécticas en función de la manipulación del operador fué de 96.91%.

**NOTA:** El contenido de AGA de la pectina comercial es de 65% y está constituida principalmente de pectina soluble en agua, por poseer elevado poder de gelificación, característica importante y deseable al ser utilizada como aditivo para alimentos (4).

## ANALISIS DE NARANJA VALENCIA.

El criterio utilizado para la caracterización de la naranja fue su apariencia general externa, que incluye: grosor de la cáscara, número de gajos, color y peso promedio por ser características de cada variedad (40).

El color de las naranjas utilizadas fue verde, moteado de anaranjado con pequeñas manchas de color café; la textura de la cáscara era lisa, delgada y de sabor ligeramente ácido.

Parámetros físicos	(Promedio por unidad)	
Grosor de la cáscara (cm)	=	0.450
Número de gajos	=	10
Peso neto promedio (g)	=	194.083

La naranja utilizada durante el desarrollo del presente trabajo, cumplió con las especificaciones formuladas en la norma de calidad correspondiente a la variedad Valencia (43). En el Cuadro No. 10 se presentan los resultados del análisis químico de la naranja.

### **CUADRO No. 10** ANALISIS QUIMICO DE LA NARANJA VALENCIA. (PROMEDIO)

Humedad de la cáscara (%)	=	7.15
Sólidos solubles en pulpa(°Brix)	=	9.30
Acidez en pulpa(%Ac. cítrico)	=	0.1955

La proporción de sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) de la Naranja y el % de acidez (% ac. cítrico) fueron útiles para determinar el índice de madurez de la fruta, al relacionar Brix/acidez, y se obtuvo un valor de 47.57.

La proporción de sólidos insolubles en alcohol (SIA) de la cáscara de naranja fue 66.87% y la de sólidos solubles en alcohol (ASS) fue 33.13%. Dicha separación se hizo con el fin de facilitar la extracción de los constituyentes pécticos presentes en la muestra.

Para la operación de filtrado, se probó el papel filtro Whatman No. 4 (para precipitados gelatinosos), los resultados mostraron rendimientos muy bajos en la recuperación de los compuestos pécticos, probablemente porque dichos compuestos se quedaron atrapados en el papel, por lo que se usó tela de tul con poro de  $0.062 \text{ mm}^2$  y se aplicó la técnica modificada con los pasos descritos anteriormente.

Dichos resultados se presentan en los cuadros Nos. 11 y 12 por haberse obtenido en extracciones efectuadas en dos días diferentes y con el objeto de analizar los resultados estadísticamente para saber si existen diferencias significativas.

La proporción de sustancias pécticas solubles en agua ( $X = 11.028\%$  AGA en cáscara seca) presentes en la muestra fue significativamente mayor que la fracción soluble en oxalato de amonio ( $X = 7.182\%$  AGA en cáscara seca) y ésta a su vez muy elevada en relación a la fracción soluble en hidróxido de sodio ( $X = 1.607\%$  AGA en cáscara seca).



**CUADRO No. 11**      CONTENIDO DE SUSTANCIAS PECTICAS EN CASCARA  
DE NARANJA VALENCIA I.

S o l u b l e   e n :

H <sub>2</sub> O *		NH <sub>4</sub> OOC(=O)ONH <sub>4</sub> 0.75% *		NaOH IN *		Totales *	
Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA
11.650	17.388	8.150	12.154	1.342	2.007	21.123	31.580
11.122	16.626	7.471	11.168	1.782	2.665	20.376	30.460
11.060	16.555	7.628	11.405	1.522	2.275	20.211	30.212
11.175	16.705	7.045	11.532	1.951	2.917	20.172	30.155
10.887	16.277	7.179	10.755	1.820	2.721	19.887	29.732

**CUADRO No. 12**      CONTENIDO DE SUSTANCIAS PECTICAS EN CASCARA  
DE NARANJA VALENCIA II.

S o l u b l e   e n :

H <sub>2</sub> O *		NH <sub>4</sub> OOC(=O)ONH <sub>4</sub> 0.75% *		NaOH IN *		Totales *	
Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA	Cáscara	SIA
10.614	15.867	6.696	10.010	1.655	2.474	18.966	28.353
11.344	16.957	6.691	9.984	1.610	2.406	19.646	28.347
11.167	16.692	7.568	11.015	1.434	2.144	19.969	29.851
10.474	15.658	6.430	9.612	1.589	2.076	18.294	27.346
10.805	16.155	7.105	10.605	1.565	2.341	19.474	29.098

\* % de Pectina como AGA (peso seco)

La cantidad de sustancias pécticas solubles en agua, fue más elevada que el valor reportado por varios autores (entre 2.59 y 1.56% AGA en cáscara seca), las solubles en oxalato de amonio ligeramente menores (entre 9.23 y 11.67%) y las correspondientes a la tercera fracción fueron menores que los valores reportados (entre 4.17 y 5.66%). Las pectinas totales resultaron de la suma de las tres fracciones y correspondió a una cantidad comparable con los valores encontrados en cáscara de naranja. (10, 35 y 39).

Dichas variaciones se deben a los factores citados en la página 25.

#### EVALUACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS.

Los datos estadísticos de precisión se presentan en el Cuadro de la página 75, cada resultado se obtuvo del promedio de cinco determinaciones del bloque correspondiente.

Los resultados de cada determinación se analizaron estadísticamente con la comparación de los conjuntos de datos -- (correspondiente a cada fracción) entre días por el método de la "t de Student" de acuerdo a las hipótesis planteadas en la metodología y se corroboró con el método aproximado.

Los resultados se muestran en el Cuadro No. 13.

En todos los casos se comparó el valor de t calculada con t 0.995 y 8 grados de libertad de tablas [ $t_{0.995(8g,1)}=3.36$ ]. En los cuatro casos la t calculada fue menor, por lo tanto -

se acepta Ho a un nivel de significancia de 0.005 (ó 99.5% de confiabilidad). Se reportan los límites de confianza de 99% para cada experimento.

**CUADRO No. 13** COMPARACION DE DOS GRUPOS DE DATOS ESTADÍSTICOS DEL CONTENIDO DE PECTINAS EN CASCARA DE NARANJA ENTRE DIAS.

Fracción Péctica	Experimento	Valor de "t" Calculada	Límites de confianza 99%	Valor de t calculada
Soluble en agua	I	1.452	10.606 - 10.744	0.364
	II		10.126 - 11.635	
Soluble en oxalato de amonio	I	2.521	6.608 - 8.411	0.897
	II		6.090 - 7.625	
Soluble en hidróxido de sodio	I	1.258	1.177 - 2.190	0.549
	II		1.437 - 1.766	
Pectinas totales	I	3.017	19.398 - 21.310	0.744
	II		17.922 - 20.618	

Para el método aproximado, se comparó Td calculada con el valor de 0.995 para  $n = 5$  reportado en tablas ( $P_{0.995}(n=5)$  0.896). Como resultado, Td calculada fue menor en todos los casos y se corroboró que no existe diferencia significativa a  $\alpha = 0.01$ . Se concluye con 99.5% de confiabilidad, que el método no difiere al efectuarse en días diferentes.

El análisis estadístico de la "t de Student" no se efectuó para los datos de SIA, ya que proporcionan las mismas conclusiones.

En las figuras de la 12 a la 15 se presentan las gráficas de frecuencia (número de muestras) contra concentración (%) de fracciones pécticas solubles en agua, oxalato de amonio, hidróxido de sodio y de pectinas totales en cáscara de naranja respectivamente.

En el cuadro No. 14 se reportan los datos estadísticos de frecuencia y concentración de sustancias pécticas en cáscara de naranja.

**CUADRO No. 14** DATOS ESTADISTICOS DE FRECUENCIA Y CONCENTRACION DE SUSTANCIAS PECTICAS EN CÁSCARA DE NARANJA.

Tipo de Pectina	Frecuencia ( % )	Rango de Concentración ( % )	Promedio de Concentración ( % )
Solubles en H <sub>2</sub> O	40	10.96 - 11.31	11.135
Solubles en NH <sub>4</sub> OCCOONH <sub>4</sub>	50	7.00 - 7.70	7.35
Solubles en NaOH	40	1.50 - 1.66	1.58
Totales	60	19.24 - 20.20	19.72

Las pectinas totales representaron de 19.24 a 20.20% de la cáscara.

FRECUENCIA DE SUSTANCIAS PECTICAS SOLUBLES EN AGUA  
DE CASCARA DE NARANJA VALENCIA

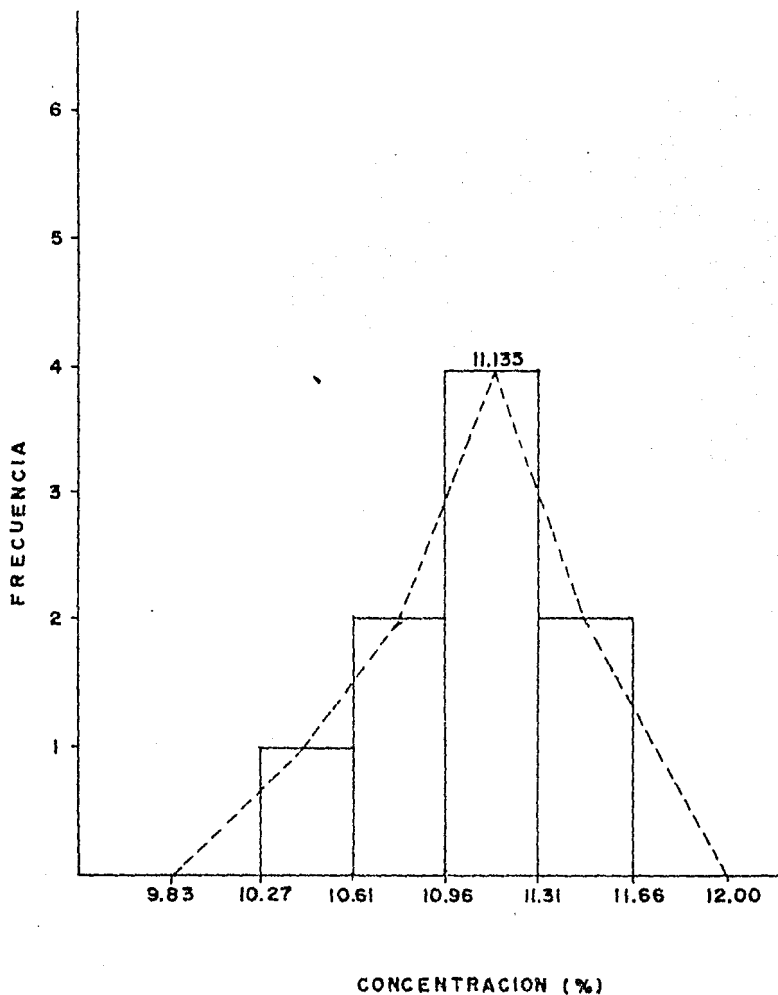


FIG. 13

FRECUENCIA DE SUSTANCIAS PECTICAS SOLUBLES EN OXALATO DE AMONIO DE CASCARA DE NARANJA VALENCIA

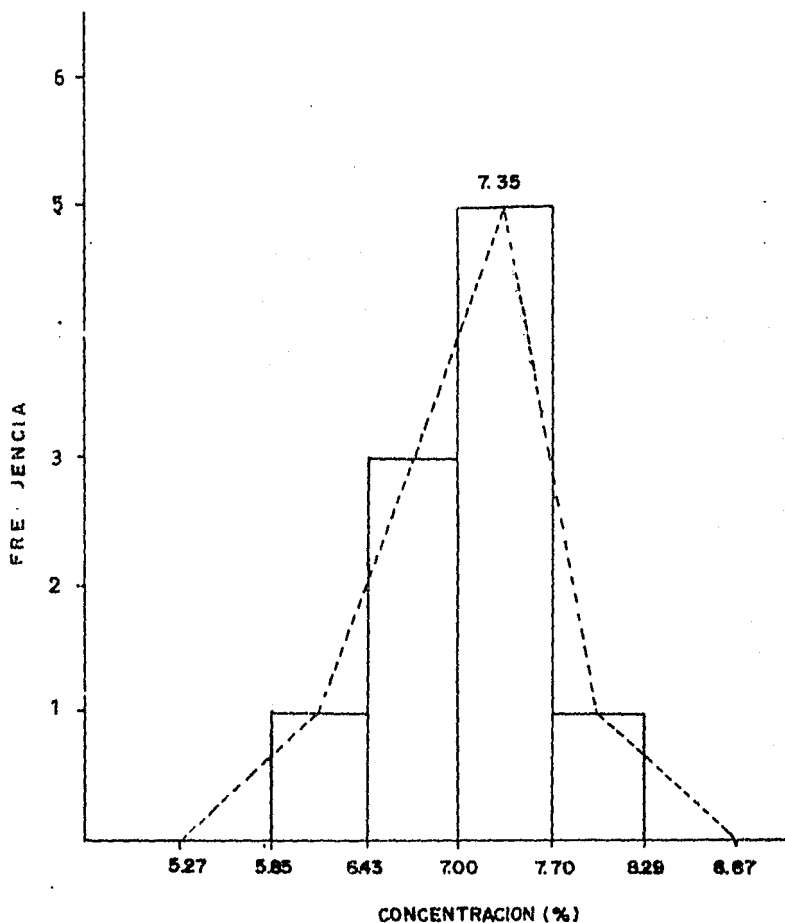


FIG. 14

FRECUENCIA DE SUSTANCIAS PECTICAS SOLUBLES EN  
HIDROXIDO DE SODIO DE CASCARA DE NARANJA

VALENCIA

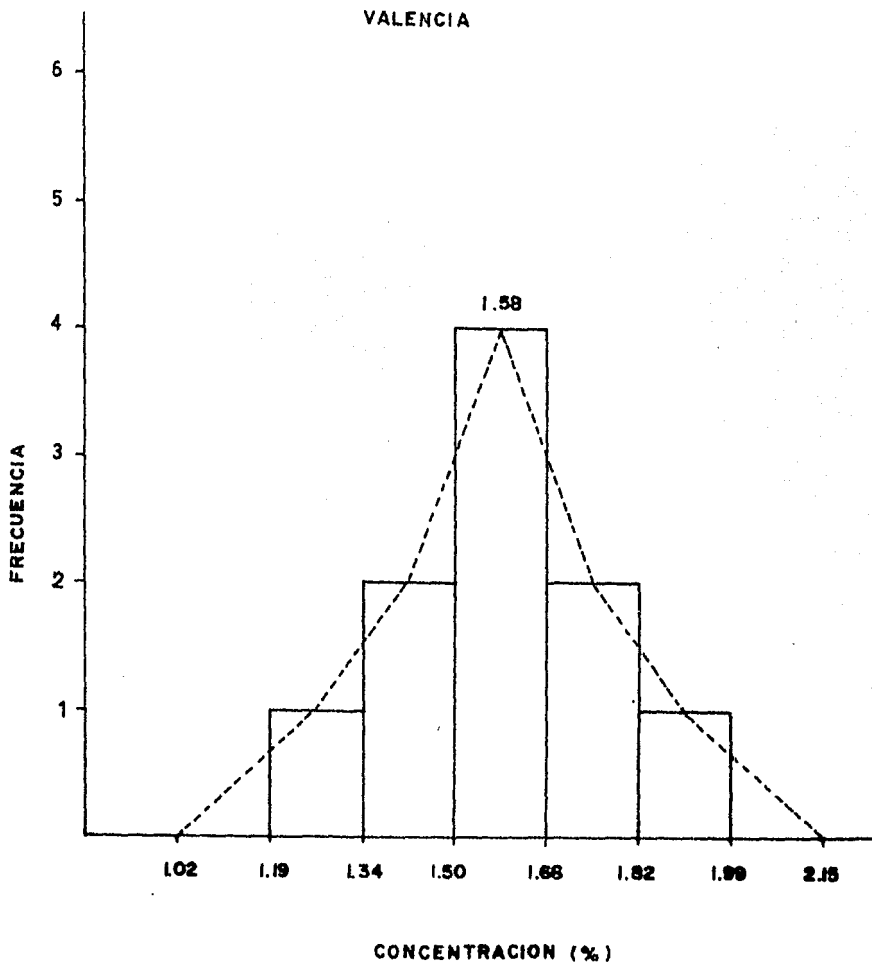
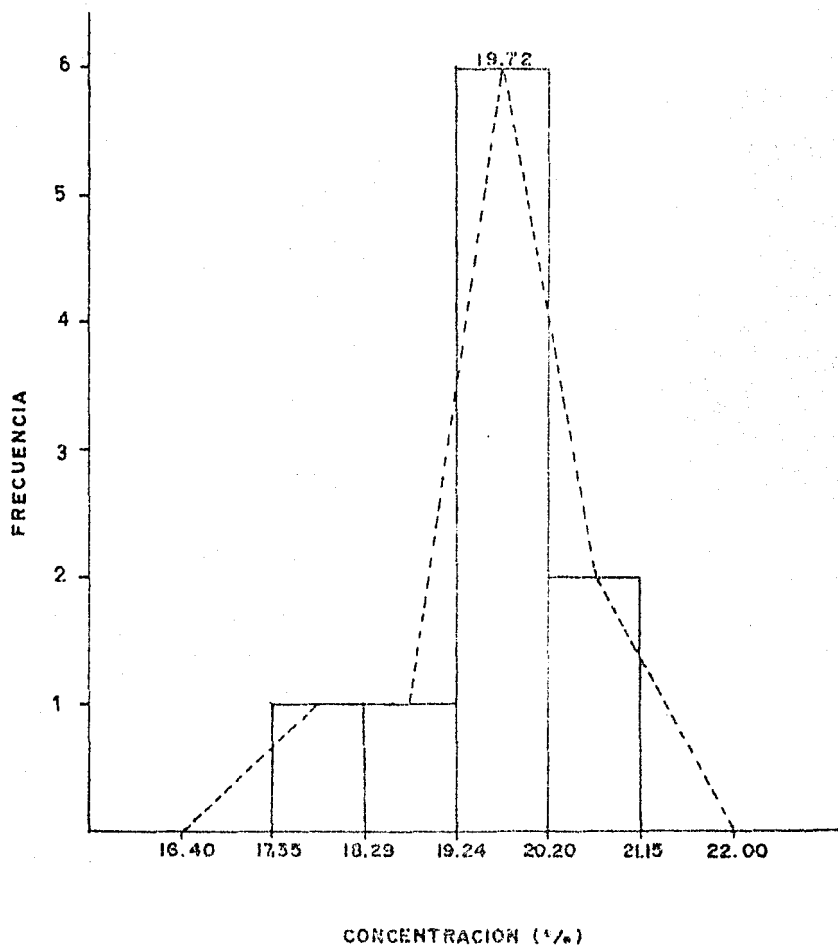


FIG. 15

FRECUENCIA PECTINAS TOTALES EN CASCARA DE  
NARANJA VALENCIA



ANALISIS DE MANGO KENT

Apariencia General Externa.

Frutos grandes de 10cm. de largo, cuyo peso promedio -- (5 det.) fue 535.84 g (peso fresco), de tamaño uniforme. La cáscara representó el 10.64% y el hueso el 10.34% del peso total del fruto.

Su forma, basta y rolliza con fondo de color amarillo - intenso con chapeo rojo obscuro y lenticelas pequeñas y amarillas, de pulpa jugosa y dulce. En el cuadro 15 se exponen los resultados del análisis químico de Mango Kent.

El mango utilizado como materia prima para la extracción de compuestos pécticos cumplió con las especificaciones descritas en la norma de calidad para el mango Kent. (8, 23)

**CUADRO No. 15**      **ANALISIS QUIMICO DEL MANGO KENT**  
(PROMEDIO)

Humedad de pulpa (%)	=	84.0335
Acidez en pulpa (%Ac. cítrico)	=	0.1661
Sólidos solubles en pulpa (°Brix)	=	14.5

Para la determinación del índice de madurez se relacionó la proporción de sólidos solubles (°Brix) en el mango Kent y el

porcentaje de acidez (ac. cítrico) correspondiente, y se obtuvo el valor de 87.29%.

Las determinaciones analíticas presentadas como parámetros para establecer la variedad del mango utilizado en este estudio, fueron seleccionadas por la facilidad y rapidez con que se determinan y por estar relacionadas directamente con la actividad bioquímica de la fruta (13, 41 y 53).

La proporción de sólidos insolubles en alcohol (SIA) de la pulpa de mango fue de 48.56%, y la de sólidos solubles en alcohol (SSA) fue 51.64% del peso total del fruto.

Para la extracción de sustancias pécticas, la técnica se modificó en algunos pasos:

1. Para la extracción de los SIA de la pulpa fue necesario fragmentar el tejido y así facilitar la operación de extracción de las sustancias solubles en etanol, la cual resultó difícil debido al gran contenido de azúcares -- presentes en el mango, por lo que se requirió de mayor volumen de disolventes (etanol y acetona) hasta la decoloración del tejido.
2. Se realizaron pruebas de filtrado con tela de tul con poro de  $0.062 \text{ mm}^2$ , sin embargo y debido a la consistencia del precipitado "tipo gel débil", éste se pasaba a través de dicha tela en la primera fracción, sin estar solubilizado, ocasionando que el rendimiento en la segunda y tercera fracción disminuyera. Es por ésto que se usó papel filtro Whatman #4 (especial para consistencia gelatinosa) y se observó mayor recuperación.

La técnica modificada para la extracción de sustancias pécticas se aplicó a pulpa de mango Kent maduro. (Cuadros 16 y 17).

**CUADRO No. 16** CONTENIDO DE SUSTANCIAS PECTICAS EN PULPA DE MANGO KENT I.

S o l u b l e e n :

Pulpa	H <sub>2</sub> O *	NH <sub>4</sub> 00CC00NH <sub>4</sub>	0.75%	NaOH IN *	Totales *		
	SIA		Pulpa		SIA	Pulpa	SIA
23.523	40.255	0.739	1.267	0.461	0.755	24.724	42.275
23.097	39.557	0.751	1.286	0.493	0.844	24.341	41.687
22.841	39.122	0.798	1.367	0.484	0.829	24.123	41.318
21.193	36.298	0.775	1.327	0.510	0.873	22.478	38.498
21.297	36.476	0.771	1.321	0.515	0.882	22.583	38.679

**CUADRO No. 17** CONTENIDO DE SUSTANCIAS PECTICAS EN PULPA DE MANGO KENT II.

S o l u b l e e n :

Pulpa	H <sub>2</sub> O *	NH <sub>4</sub> 00CC00NH <sub>4</sub>	0.75%	NaOH IN *	Totales *		
	SIA		Pulpa		SIA	Pulpa	SIA
22.146	37.930	0.748	1.281	0.442	0.758	23.337	39.969
24.791	42.462	0.727	1.246	0.493	0.844	26.012	44.553
23.019	39.431	0.702	1.203	0.451	0.773	24.173	40.634
25.078	42.953	0.758	1.299	0.489	0.838	26.326	45.090
23.001	39.400	0.725	1.242	0.475	0.814	24.201	41.456
21.709	37.188	0.689	1.181	0.442	0.758	22.842	38.127

\* % de Pectina como AGA (peso seco)

Los resultados anteriores se presentan en dos cuadros por haberse efectuado las extracciones en dos días diferentes y para analizarlos estadísticamente con el fin de saber si existen diferencias significativas.

La proporción de pectinas solubles en agua fue considerablemente mayor ( $\bar{X} = 22.867\%$ ) que la correspondiente a la fracción soluble en oxalato de amonio ( $\bar{X} = 0.746\%$ ) y ésta a su vez mayor que la tercera fracción, soluble en hidróxido de sodio ( $\bar{X} = 0.478$ ). La suma de las tres fracciones, (pectinas totales) fue similar a los valores reportados en la bibliografía citada ( $\bar{X} = 24.490\%$ ) (6 y 42).

En el Cuadro No. 18 se reportan datos de precisión en cáscara de Naranja Valencia y en pulpa de Mango Kent. (Cada dato resultó del promedio del conjunto de datos respectivo).

La amplitud y desviación estándar estimada, son medida de la precisión, se indica que entre mayores sean tales valores existirá menor precisión (17 y 19). Por lo tanto, para la cáscara de naranja, se obtuvo mayor precisión en la fracción soluble en hidróxido de sodio que en la soluble en agua y ésta a su vez fue mayor que la soluble en oxalato de amonio. -- Los valores correspondientes a las pectinas totales, fueron -- mayores que los referentes a cada una de éstas, demostrando -- menor precisión. Al ensayar la técnica en pulpa de mango, se presentó menor precisión en la porción soluble en agua que en soluble en oxalato de amonio, y ésta menor que la soluble en hidróxido de sodio. La técnica fue menos precisa para pectinas totales.

Los resultados de las determinaciones (de cada fracción) se compararon estadísticamente por el método de la "t de Student" (Cuadro No. 19) considerando las hipótesis planteadas en la

metodología. Para pulpa de mango, no fue posible corroborar los datos obtenidos con el método aproximado, ya que éste último requiere el mismo número de datos en cada grupo para ser eficaz (11).

Se comparó el valor de  $t$  calculada con  $t_{0.995}$  y 9 grados de libertad de tablas ( $t_{0.995} (9g.l) = 3.25$ ). En todos los casos,  $t$  calculada fue menor que  $t$  de tablas y se acepta  $H_0$  a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.005$ ; así como se reportan sus límites de confianza.

No se realizó el análisis estadístico de la "t de Student" para los datos de SIA debido a que presentan un comportamiento similar.

En las figuras de la 16 a la 19 se muestran las gráficas de frecuencia (número de muestras) contra concentración (%) de fracciones pécnicas solubles en agua, oxalato de amonio, hidróxido de sodio y las pectinas totales en pulpa de mango Kent, respectivamente.

En el Cuadro No. 20 se expone el porcentaje más alto de frecuencia de pectinas en pulpa de Mango Kent y el rango de concentración correspondiente. Las pectinas totales, representaron el rango de 23.760 a 25.050%.

CUADRO No. 18

DATOS COMPARATIVOS DE PRECISION EN CONCENTRACION  
DE PECTINAS.

Experimento	Fracción	CASCARA DE NARANJA VALENCIA			PULPA DE MANGO KENT		
		Promedio	Amplitud	Desviación estándar estimada	Promedio	Amplitud	Desviación estándar estimada
I	Soluble en H <sub>2</sub> O	11.175	0.743	0.319	22.390	2.330	1.002
II	Soluble en H <sub>2</sub> O	10.881	0.869	0.373	23.344	3.686	1.456
I	Soluble en NH <sub>4</sub> OCCOONH <sub>4</sub>	7.506	1.104	0.474	0.767	0.058	0.025
II	Soluble en NH <sub>4</sub> OCCOONH <sub>4</sub>	6.857	0.937	0.403	0.725	0.068	0.027
I	Soluble en NaOH	1.683	0.609	0.261	0.492	0.054	0.023
II	Soluble en NaOH	1.531	0.266	0.114	0.465	0.050	0.019
I	Pectinas to- tales	20.354	1.236	0.531	23.454	2.246	0.965
II	Pectinas to- tales	19.270	1.675	0.720	24.482	3.484	1.376

CUADRO No. 19

COMPARACION DE LOS GRUPOS DE DATOS ESTADÍSTICOS DEL CONTENIDO DE PECTINAS EN PULPA DE MANGO KENT ENTRE DIAS.

Fracción Pécica	Experimento	Valor de t Calculada	Límites de Confianza 99%
Soluble en H <sub>2</sub> O	I	-1.210	20.178 - 24.602
	II		20.945 - 25.744
Soluble en NH <sub>4</sub> OOCCOONH <sub>4</sub>	I	2.813	0.720 - 0.813
	II		0.682 - 0.768
Soluble en NaOH	I	1.939	0.448 - 0.537
	II		0.427 - 0.503
Pectinas Totales	I	1.126	21.923 - 27.722
	II		21.930 - 25.370

**CUADRO No. 20** DATOS ESTADISTICOS DE FRECUENCIA Y -  
CONCENTRACION DE SUSTANCIAS PECTICAS  
EN PULPA DE MANGO KENT.

Tipo de Pectina	Frecuencia (%)	Rango de Concentración (%)	Promedio de - Concentración
Soluble en H <sub>2</sub> O	45	22.490 - 23.800	23.145
Soluble en NH <sub>4</sub> OOC <sup>-</sup> COONH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	36	0.753 - 0.761	0.747
Soluble en NaOH	36	0.479 - 0.497	0.488
T O T A L	45	23.760 - 25.051	24.405



FRECUENCIA DE SUSTANCIAS PECTICAS SOLUBLES EN AGUA  
EN PULPA DE MANGO KENT

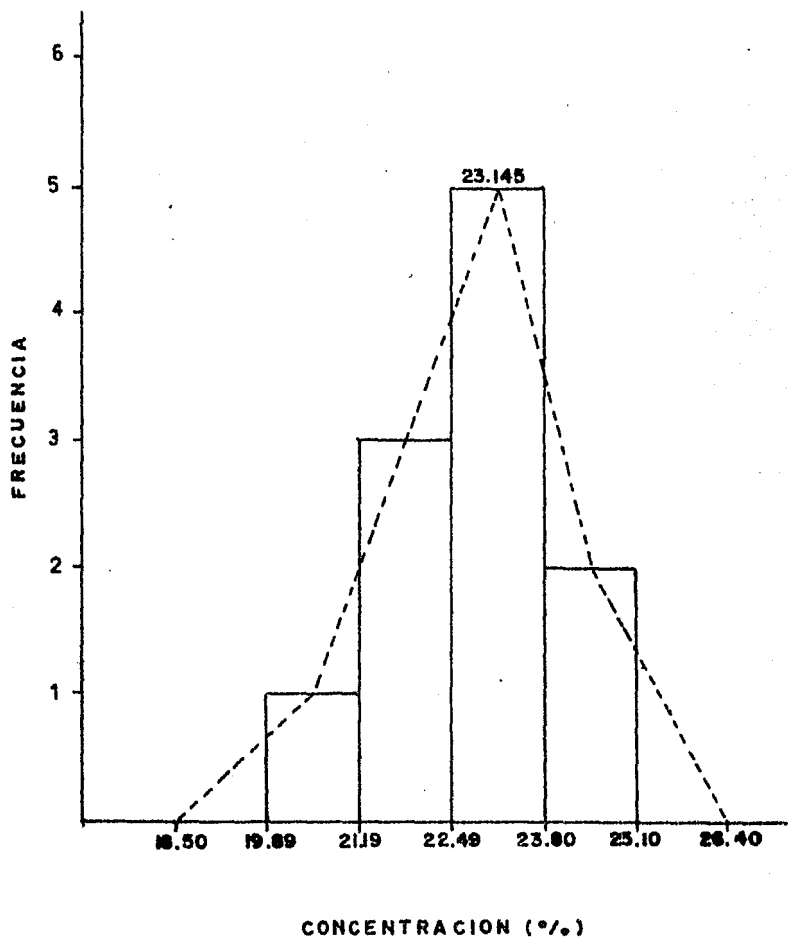
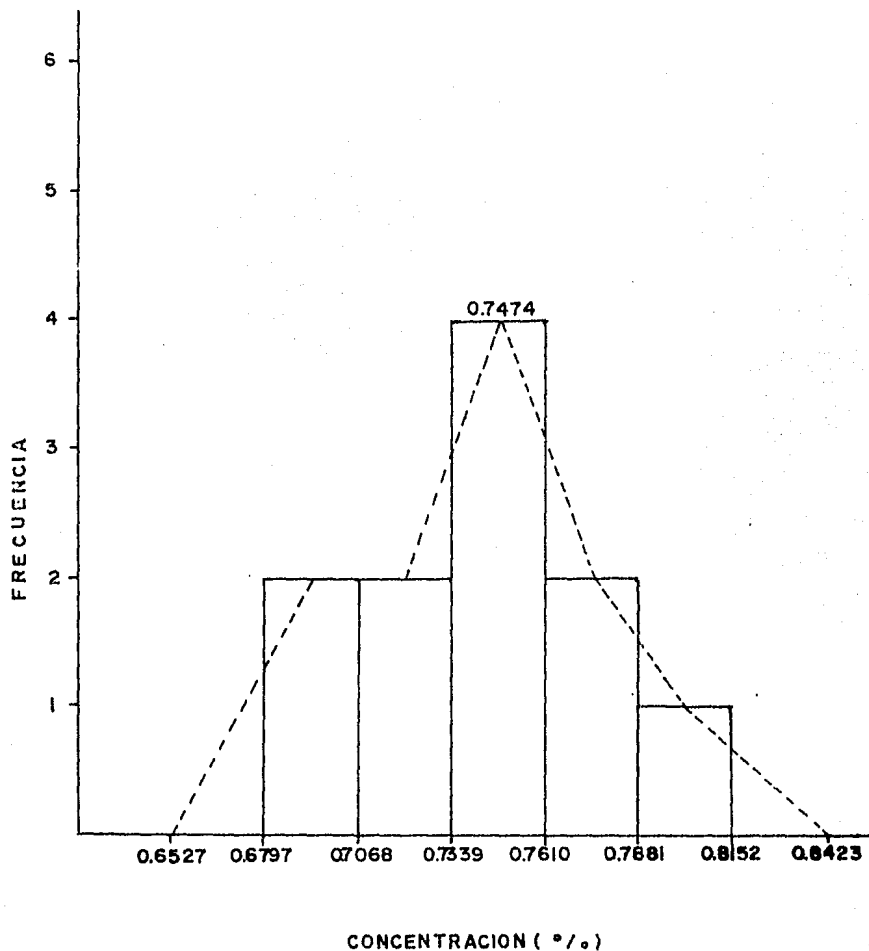


FIG. 17

FRECUENCIA DE SUSTANCIAS PECTICAS SOLUBLES EN  
OXALATO DE AMONIO DE PULPA DE MANGO KENT

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



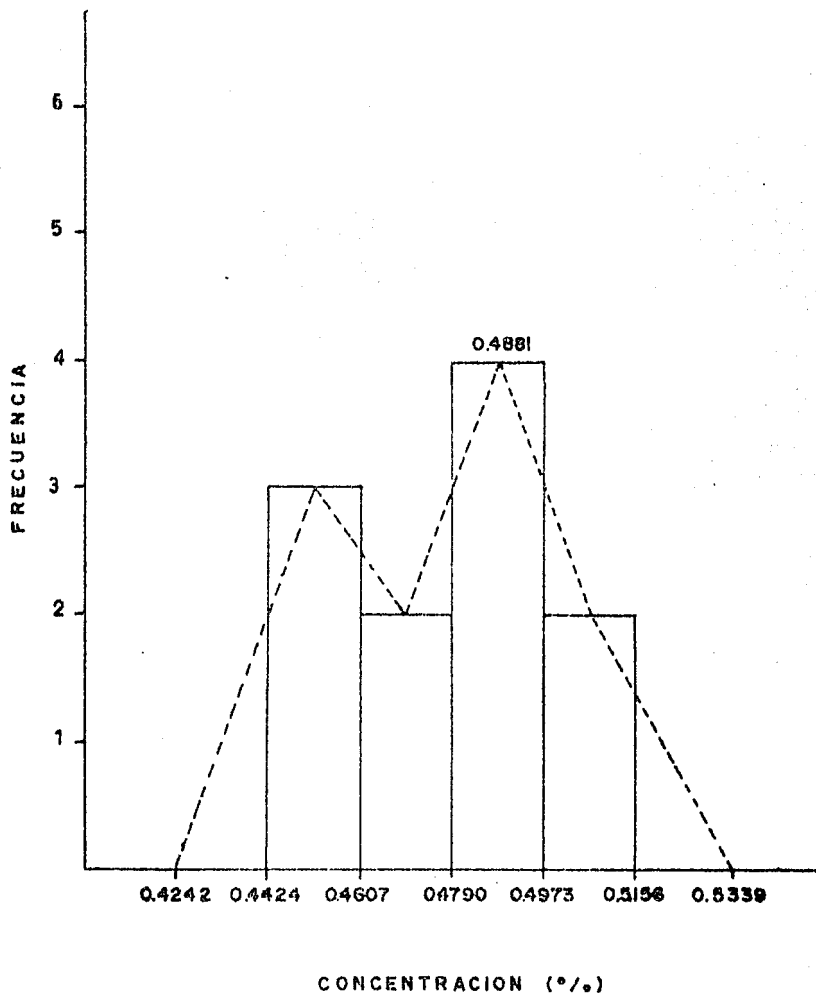
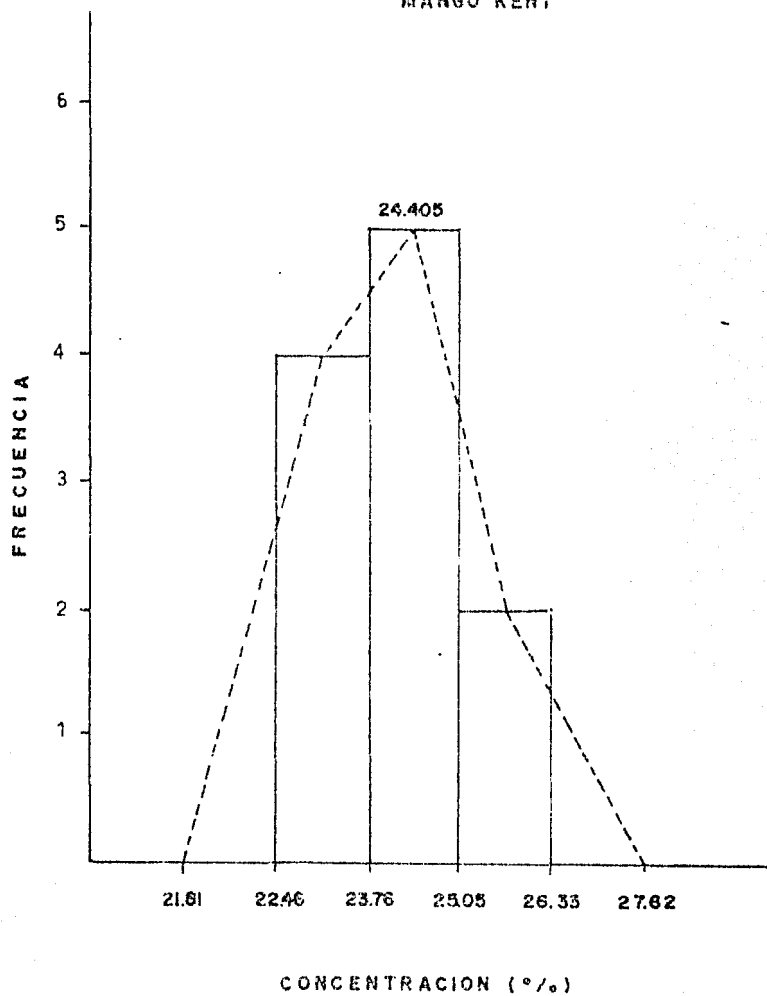
FRECUENCIA DE SUSTANCIAS PECTICAS SOLUBLES EN HIDROXIDO  
DE SODIO EN PULPA DE MANGO KENT

FIG. 19

FRECUENCIA DE PECTINAS TOTALES EN PULPA DE  
MANGO KENT

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

El deseo de seguir los cambios péclicos durante la maduración, almacenamiento ó procesamiento de frutos ha conducido a desarrollar procedimientos de extracciones fraccionales. Se conocen numerosos datos acerca de la composición química de las pectinas extraídas, pero son limitados acerca de la velocidad y grado de recuperación de las mismas por lo que el presente estudio se enfocó hacia la modificación de una técnica ya existente con el fin de lograr mayor recuperación de los compuestos péclicos, de lo cual fué posible obtener las siguientes conclusiones:

- 1.- La técnica original, sin modificaciones sólo es útil para la determinación de fracciones péclicas a partir de jugos de frutos, los cuales contienen pequeña proporción de dichos compuestos, siendo necesaria la adecuación de la técnica cuando se requiere efectuar el análisis en cáscara de naranja y pulpa de mango por ser fuentes importantes de pectina. El tejido de planta usado puede afectar la calidad de extracción, la cantidad de pectina extraída y sus características.
- 2.- Los sólidos insolubles en alcohol contienen elevada proporción de compuestos péclicos, por lo que el uso de 0.25 g. de SIA (peso seco) como tamaño de muestra fué el más adecuado, facilitando así su manejo durante la operación.
- 3.- Para extraer las sustancias péclicas presentes en una muestra debe considerarse la composición aproximada de la fruta en cuestión para ajustar el volúmen necesario y así favorecer el rendimiento de la extracción.
- 4.- Se prefieren varias extracciones sucesivas con menor volúmen de disolvente y por periodos cortos a una simple extracción por más tiempo. En el caso de las sustancias péclicas de alto metoxilo (solubles en agua) se determinó que cuatro

lavados de 100 ml. por 15 min. cada uno fueron suficientes para extraer la mayor cantidad de pectina; para la fracción de bajo metoxilo (soluble en oxalato de amonio) cuatro lavados de 60 ml. por 15 min. cada uno y para la protopectina (soluble en hidróxido de sodio) un lavado de 50 ml. por 15 min.

5.- Para realizar la extracción de pectina de bajo metoxilo es necesaria la adición de oxalato de amonio 0.75%, el cual al actuar como agente ligante de los iones calcio y magnesio solubiliza tales compuestos. Un exceso del mismo dificulta la operación y por lo tanto disminuye la recuperación. Con la finalidad de reducir la variabilidad de los resultados, se hizo necesario incrementar ligeramente la temperatura de a disolución de oxalato ( $t=40 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

6.- Bajo las condiciones experimentales de este estudio, se observó que cada fracción péctica posee características de solubilidad específicas, sin presentarse influencia en la recuperación de cada una de ellas.

7.- El porcentaje de recuperación de las sustancias pécticas con el uso de la técnica modificada fué de 96.91%.

8 - En el caso de Naranja Valencia (cáscara) la pectina soluble en agua representó un porcentaje de 11.135, la soluble en oxalato de amonio 7.35 y la soluble en hidróxido de sodio 1.58.

9.- En el Mango Kent (pulpa) la fracción soluble en agua correspondió al 23.145 por ciento, la porción soluble en oxalato de amonio 0.747 y la soluble en hidróxido de sodio 0.488.

10.- Con base a los resultados obtenidos al aplicar el modelo estadístico de la "t de Student" a cáscara de naranja y pulpa de mango no se encontro diferencia significativa.

11.- Al aplicar la técnica modificada sobre los frutos en cuestión y analizar los datos estadísticos de precisión (amplitud del rango y desviación estándar estimada) en concentración de pectinas se encontró que:

- En cáscara de naranja la técnica fué más precisa para la extracción de protopectina (soluble en hidróxido de sodio) y menos para la fracción péctica de bajo metoxilo (soluble en oxalato de amonio).
- En pulpa de mango la técnica mostió mayor precisión para la extracción de protopectina y menor para la porción péctica de alto metoxilo (soluble en agua).
- Al considerar los datos de pectinas totales, la técnica resultó ser más precisa para cáscara de naranja.



## RECOMENDACIONES

Los factores necesarios para obtener un buen rendimiento y resultados reproducibles en la extracción y cuantificación de los compuestos pécticos son los siguientes:

- 1.- Determinar el estado de madurez de los frutos a analizar con el fin de obtener muestras de composición uniforme.
- 2.- Para realizar la operación de filtrado que sigue a cada lavado de extracción, donde la centrifugación permite separar claramente dos fases se recomienda el uso de tela de tul de tamaño de poro de  $0.062\text{ mm}$ . Si con dicha operación no se distinguen las fases y se forma un gel débil, dicha tela debe sustituirse por papel filtro Whatman No. 4.
- 3.- No rebasar los  $50^{\circ}\text{C}$  porque la calidad de las sustancias pécticas se deteriora en apariencia al incrementar la temperatura.
- 4.- Asegurar que las extracciones alcohólicas sean suficientes para arrastrar las posibles interferencias como azúcares y ácidos orgánicos ya que éstos pueden reaccionar con el carbazol para dar productos coloridos de intensidad variable.
- 5.- Durante la cuantificación, la adición de ácido sulfúrico (6 ml.) debe realizarse en menos de 10 seg. para obtener temperatura de  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$  de otra manera se producen intensidades variables de color rojo (24). Asimismo, la lectura de las muestras no debe realizarse después de 30 min. de haberse desarrollado el color, ya que éste se va perdiendo con el tiempo.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

---

---

- 1.- Alcalá, L.G., y Sosa, G.C., "Optimización del Proceso de Extracción de Pectina a Partir de Corteza Seca de Limón".- Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Químicas.UNAM, México, D.F. (1980)
- 2.- Association of Official Analytical Chemists A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. Washington 20044 (1975)
- 3.- Badui, D.S., "Química de los Alimentos". Ed. Alhambra Mexicana, México, pp. 91-95 (1981)
- 4.- Baker, R.A., "The Role of Pectin in Citrus Quality and Nutrition". In Citrus Nutrition and Quality, Nagy, S. and Attaway, J. (editors) A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 109-124 (1980)
- 5.- Braverman, J.D.S. "Introducción a la Bioquímica de Alimentos". Editorial Omega, S.A. Barcelona, pp. 111-114, 121-122 (1980)
- 6.- Bonewoo, R., and Brummer, J., "Changes in Pectic Substances and Enzymes During Ripening and Storage of Keitt Mandarins". J. Food Science 46, pp.180-189 (1981)
- 7.- Boothby, D., "The Pectic Components of Plum Fruits". Phytochemistry 19, pp. 1949-1953 (1980)
- 8.- CONAFRUT. "Primer Anteproyecto de Especificaciones de Calidad de Mango Fresco (Mangífera Indica) Tipos Manila y Criollo". México, (1980)
- 9.- Courad, E.H., et al., "An Enzyme System for Cycling Ketone Lactonization". Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 6, No. 4 pp. 293-297 (1961)
- 10.- García, A.C., "Estudio para la Obtención de Pectina a Partir de la Cáscara de Naranja".- Tesis. ENCB, México, D.F. (1980)
- 11.- Hinchey, J.D., "Estadística Práctica para la Investigación Química". Editorial El Manual Moderno, México, pp. 8-24 (1976)
- 12.- Hsu, C.P., et al., "The Role of Pectin Methylsterase in -

- Firmness of Canned Tomatoes". *J. Food Science* 28, pp. 583-588 (1965)
- 13.- Hulme, A.C., "The Mango". in *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. Vol. 2, Academic Press Inc., London (1971)
  - 14.- Joslyn, M.A.. "The Chemistry of Protodectin: A Critical Review of Historical Data and Recent Developments". in *Advances in Food Research*. Vol. 1, C.O. Chichester, E.M. Mrak, and G.P. Stewart (editors). Academic Press, New York (1962)
  - 15.- Joslyn, M.A., and Devel, H., "The Extraction of Pectins from Apple Marc Preparations". *J. Food Science* 28, pp. 65-85 (1963)
  - 16.- Kirk, O., "Pectinas" en *Enciclopedia de la Tecnología Química*. Vol. 11. Ed. UTEHA, México, pp. 782-812 (1972)
  - 17.- Larmond, E., "Laboratory Methods for Sensory Evaluation of Food". Canada Department of Agriculture. Ottawa, Ontario (1977)
  - 18.- León, M.A., "Industrialización de Variedades Mejoradas de Mango Kent y Keitt".- Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Químicas. UNAM, México, D.F. (1982)
  - 19.- Little, T.M., and Hills, J.F., "Métodos Estadísticos para la Investigación en la Agricultura". Ed. Trillas, México, D.F. (1984)
  - 20.- Loewus, F.A., and Kelly, S., "The Metabolism of D-Galacturonic Acid and its Methyl Ester in the Detached Ripening Strawberry". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, pp. 483-493 (1961)
  - 21.- Loewus, F.A., and Kelly, S., "Conversion of Glucose to Inositol in Parsley Leaves". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7 (3), (1962)
  - 22.- Loewus, F.A., "A Proposed Pathway for the Biosynthesis of Pectin and Methylated Uronic Acid Residues". *Nature* 202, pp.1775-1776 (1964)

- 23.- Malevski, Y., et al., "External Color as Maturity Index of Mango". *J. Food Science* 42(5), pp. 1516-1518 (1977)
- 24.- Mc. Comb, E.A., and Mc. Cready, R.M., "Colorimetric Determination of Pectic Substances". *Analytical Chemistry* 24(10), pp. 1630-1632 (1952)
- 25.- Mc. Cready, R.M., and Mc. Comb, E.A., "Extraction and Determination of Total Pectic Materials in Fruits". *Analytical Chemistry* 34(2), pp. 1986-1988 (1952)
- 26.- Mc. Comb, E.A., and Mc. Cready, R.M., "A Method for the Characterization of Pectic Substances in Some Fruit and Sugar Beet Marcs". *Food Research* 23 pp. 72-75 (1953)
- 27.- Mc. Comb, E.A., and Mc. Cready, R.M., "Pectic Constituents in Ripe and Unripe Fruit". *Food Research* 19, pp. 530-535 (1954)
- 28.- Mc. Cready, R.M., "Pectin" In *Methods in Food Analysis*. Joslyn, M.A., *Food Science and Technology Series*, 2nd. edition pp. 565-599 (1977)
- 29.- Padival, R.A., et al., "Stability of Pectins During Storage". *J. Food Technology* 16, pp. 367-379 (1981)
- 30.- Pantástico, E.B., "Fisiología de la Postrecolección, Manejo y Utilización de Frutas y Hortalizas Tropicales y Subtropicales". Ed. CEGSA, imp. en México, México D.F., pp. 77-111 (1979)
- 31.- Pressey, R., et al., "Development of Policalacturonase Activity and Solubilization of Pectin in Peaches During Ripening". *J. Food Science* 36, pp. 1070-1073 (1971)
- 32.- Pilnik, W., and Voráček G.J., "Pectic Substances and Other Uronides" in *The Biochemistry of Fruits*, Vol. 1, Hulme, A.C. (editor). Academic Press, New York, pp. 53-87 (1970)
- 33.- Ranganna, S. "Manual of Analysis of Fruits and Vegetable Products". Central Food Technology Research Inst. Mysore, Mc. Graw Hill Pub. Co. Ltd. New Delhi, (1978)
- 34.- Rouse, A.H., and Atkins, C.D., "Pectinesterase and Pectin in Commercial Citrus Juices as Determined by Methods Used

- at the Citrus Experimental Station". Bull. 570, Florida Agr. Expt. Sta., Gainesville, Fla. pp. 3-17 (1955)
- 35.- Rouse, A.H., et al., "Seasonal Changes Occurring in the Pectinesterase Activity and Pectic Constituents of the Component Parts of Fruits. I. Valencia Oranges". J. Food Science 27, pp. 417-425 (1962)
- 36.- Rouse, A.H., "Pectin: Distribution, Significance", in Citrus Science and Technology, Vol. 1 Nagy, S., et al. (editors), The AVI Publishing Company, Connecticut, - pp. 111-198 (1977)
- 37.- Royo, I.J., "Las Sustancias Pécicas", Revista de Ciencia Aplicada 1 (40), pp. 416-422 (1954)
- 38.- Royo, I.J., "Las Sustancias Pécicas II". Revista de -- Ciencia Aplicada 11 (41) pp. 493-506 (1954)
- 39.- Royo, I.J., et al., "Contenido en Pectina de las Fases-Líquida y Sólida de Zumo de Naranja y del Extracto Acuoso de la Corteza". Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos 17(1), pp. 79-85 (1977)
- 40.- Royo, I.J., et al., "Preparación de Corteza Seca de Naranja para la Obtención de Pectina a Partir de Variedades Cultivadas en España. Rendimiento y Calidad del Producto". Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 20 (3), pp. 399-402 (1980)
- 41.- Saeed, A.R., et al., "Characterization of Pectic Substances in Mango Marc". J. Food Science 40. pp. 205-206(1975)
- 42.- Salazar, C.E., y Paz, G.S., "Cuantificación y Caracterización de Pectinas en Cáscara de Mango".- Tesis. Ingeniería Bioquímica de Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit (1983)
- 43.- Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Norma Oficial Mexicana. "Productos Alimenticios no Industrializados para Uso Humano-Fruta Fresca-Naranja Dulce (Citrus sinensis, [L] Osbeck) en Estado Fresco (1979)
- 44.- Shat, J.B., "Influence of Extracting Agents During the -

- Colorimetric Determination of Pectic Substances". *J. Food Science* 36, pp. 109-111 (1978)
- 45.- Shewfelt, A.L., "Changes and Variations in the Pectic Constitution of Ripening Peaches as Related to Product Firmness". *J. Food Science* 50, pp. 573-576 (1965)
  - 46.- Shewfelt, A.L., and Paynter, V., "Textural Changes and Molecular Characteristics of Pectic Constituents in Ripening Peaches". *J. Food Science* 36(3), pp. 573-575 (1971)
  - 47.- Sinclair, W.B., and Jolliffe, V. A., "Methods of Analysis of Soluble Carbohydrates and Pectic Substances of Citrus Fruits". Paper No. 1176, University of California, pp. 148-156 (1959)
  - 48.- Sinclair, W., "Pectic Substances" in "The Orange. Its Biochemistry and Physiology". Sinclair W (editor). University of California, Division Agricultural Sciences, USA, pp. 191-229 (1961)
  - 49.- Sinclair, W., and Jolliffe, V., "Pectic Substances of Valencia Oranges at Different Stages of Maturity". *J. Food Science* 29, pp. 125-150 (1961)
  - 50.- Somogi, L.P., and Romani, R.J., "Irradiation-Induced Textural Changes in Fruits and its Relation to Pectin Metabolism". *J. Food Science* 29, pp. 366-371 (1964)
  - 51.- Srirangarjan, A.N., and Shrikhande, A.H., "Comparative Aspects of Mango Extracted from the Peels of Different Varieties of Mango". *J. Food Technology* 14, pp. 539-541 (1979)
  - 52.- Tinay, A.H., et al., "Fractionation and Characterization of Guava Pectic Substances". *J. Food Technology* 14, pp. 343-349 (1979)
  - 53.- Velazco, C.J., "El Mango en México. Descripción, Cultivo, Mejoramiento y Utilización". CONAFRUT, Serie de Investigaciones Fisiológicas No. 6 Sag. México p. 97 (1975)
  - 53.- Worth, H.G., "The Chemistry and Biochemistry of Pectic -

Substances". Chemical Reviews, pp. 465-473 (1967)



## **APENDICES**

---

---

## Preparación de Sólidos Insolubles en Alcohol (SIA)

Mezclar 200 g. de rebanadas frescas con 600 ml. de alcohol etílico 95%. Mantener la mezcla en baño de vapor 20 min., enfriar rápidamente a temperatura ambiente y filtrar a través de papel Whatman No. 2 con ayuda de vacío. Lavar el residuo insoluble en alcohol con cuatro porciones de 200 ml. de alcohol etílico 95% seguido de una porción de 200 ml. de alcohol etílico absoluto y dos porciones de 100 ml. de acetona. Secar el residuo durante el noche a  $48 \pm 2^\circ\text{C}$ , pesar y moler. Usar el residuo para la determinación de la constitución péctica. (45)

## Separación de Fracciones Péclicas.

Acidos Pectínicos. Colocar muestras de 2.5 g. de SIA en tubos de centrífuga de 250 ml. Humedecer cada muestra con alcohol etílico y añadir 50 ml. de agua destilada a cada tubo, agitar vigorosamente y dejar en reposo una hora a temperatura ambiente. Centrifugar las mezclas a 2000 rpm durante 10 min. y combinar los sobrenadantes. Repetir esta extracción acuosa dos veces y combinar los extractos. Filtrar el extracto combinado (con succión) a través de tela de tul y reducir a  $\frac{1}{2}$  de su volumen bajo presión reducida a  $50^\circ\text{C}$ . Mezclar el extracto concentrado con 1000 ml. de alcohol etílico 95% acidificado con 2 ml. de ácido clorhídrico concentrado para precipitar los ácidos pectínicos. Dejar en reposo el precipitado durante varias horas para obtener un cuajado firme. Decantar el exceso de alcohol y secar el precipitado con succión. Cuando esté casi seco, transferirlo en 100 ml. de solución de hexametáfosfato de sodio 1%. Agitar la mezcla hasta disolver el precipitado y aforar a 250 ml. con la solución de hexametáfosfato. Cuantificar -

colorimétricamente.

Acido Pécrico.- Extraer los residuos de la extracción acuosa con 50 ml. de una solución que contenga 0.2% de ácido oxálico y 0.1% de oxalato de amonio. El procedimiento es el mismo que en la extracción acuosa excepto que se añade una pequeña cantidad de antiespumante durante la concentración de los extractos. Aforar la preparación final con la solución de hexametáfosfato. Cuantificar colorimétricamente.

Protepectina.- Añadir 50 ml. de ácido clorhídrico 0.1N a cada residuo de la extracción de ácidos pécticos y calentar a 80°C durante una hora. Después de centrifugar y decantar el sobrenadante, realizar dos extracciones más con 50 ml. de una solución de ácido clorhídrico 0.05N, y añadir una pequeña cantidad de antiespumante durante la extracción final a 200 ml. con la solución de hexametáfosfato. Cuantificar colorimétricamente. (46)

## Extracción de Sustancias Péclicas.

Mezclar el jugo de cítricos ó concentrado durante unos minutos. Pesar 16 g. de jugo ó 4 g. de concentrado en un tubo de centrífuga de 50 ml. Añadir a los 4 g. de concentrado 12 ml. de agua destilada. Calentar a 75°C. añadir alcohol etílico a un volúmen de 40 ml. y calentar la mezcla durante 10 min. en baño de agua a 85°C con agitación ocasional. Enjuagar el agitador con alcohol etílico 95% y llevar a un volúmen de 50 ml. en el tubo. Centrifugar el tubo a 2500 rpm durante 15 min. Decantar y descartar la solución sobrenadante. Repetir el lavado con alcohol etílico 65% caliente durante 10 min. en un baño de agua a 85°C. Centrifugar, decantar nuevamente y descartar el sobrenadante.

Añadir 5 ml. de agua destilada al tubo y dispersar el precipitado con un gendarmen. Enjuagar el gendarmen con agua destilada a un volumen de 55 ml. y mezclar vigorosa y continuamente durante 10 min. (Esto se logra con un agitador mecánico ó burbujeando aire a través de la mezcla en el tubo. El burbujeo se logra conectando a una fuente de aire un tubo capilar, el cual se inserta en el tubo de centrífuga). Enjuagar el agitador con 5 ml. de agua destilada incrementando el volumen a 40 ml. Centrifugar el tubo a 2500 rpm durante 15 min. y decantar el líquido a un matraz volumétrico de 100 ml. Repetir la extracción con agua y después de centrifugar, decantar al mismo matraz volumétrico. Añadir 5 ml. de hidróxido de sodio 1 N al extracto acuoso y aforar. Mezclar y dejar en reposo 15 min. antes de comenzar el procedimiento colorimétrico.

Al residuo en el tubo de centrífuga, añadir 5 ml. de solución de oxalato de amonio 0.75% y dispersar el precipitado con un gendarmen. Enjuagar el gendarmen con oxalato de amonio

llevar a volumen de 35 ml., mezclar vigorosa y continuamente durante 10 min. Incrementar el volumen a 40 ml. con la solución de oxalato. Centrifugar y decantar a un matraz volumétrico de 100 ml. Repetir la extracción con la solución de oxalatos. Añadir 5 ml. de hidróxido de sodio 1 N al extracto de oxalato y aforar. Mezclar y dejar en reposo 15 min. antes de cuantificar colorimétricamente.

Lavar el residuo remanente en el tubo de centrífuga a un matraz volumétrico de 100 ml. Añadir 5 ml. de hidróxido de sodio 1 N y aforar con agua destilada. Mezclar, dejar en reposo 15 min. con agitación ocasional y filtrar.

Analizar alícuotas de 1 ml. de cada extracto por el método colorimétrico. (46 y 52)

## APENDICE 3.

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.

A	= Arabinosa, Amplitud del conjunto de datos.
AGA	= Acido Anhidrogalacturónico.
A.O.A.C.	= Association of Official Agricultural Chemists.
°Brix	= Grados Brix.
°C	= Grado(s) Centígrado(s).
cm	= Centímetro(s).
DPNH	= Difosfo-piridín nucleótido.
D.S.M.	= Diferencia Significativa Mínima.
EDTA	= Acido etilén-diamín tetra acético
Fig.	= Figura.
FMN	= Flavín mono nucleótido.
g	= Gramo(s).
G	= Galactosa.
GA	= Acido Galacturónico.
g.l.	= Grados de libertad.
H <sub>0</sub>	= Hipótesis planteada en el diseño experimental.
min.	= Minuto(s).
ml.	= Mililitro(s).
mm <sup>2</sup>	= Milímetro(s) cuadrado(s).
n	= Número de repeticiones de cada conjunto de datos.
N	= Normalidad (concentración).
nm	= Nanómetro(s).
No.	= Número.
pH	= Potencial de Hidrógeno.
rpm	= Revoluciones por minuto.
S	= Desviación estándar.
Sc	= Desviación estándar de dos grupos de datos.
SIA	= Sólidos Insolubles en Alcohol.
SSA	= Sólidos Solubles en Alcohol.

- T = Temperatura.
- $t_c$  = Valor "t" de Student calculada para el análisis estadístico.
- $\mu g$  = Microgramo(s).
- $\mu, \bar{X}$  = Media Poblacional.
- Vol. = Volumen.
- 
- % = Por ciento.
- < = Menor que.
- > = Mayor que.
- $\alpha$  = Nivel de Significancia.

Esta publicación se imprimió  
en la Subdirección de Inves-  
tigación y Docencia. Consta  
de 100 ejemplares.

Comisión Nacional de Fruticultura-S.A.R.H.  
Subdirección de Investigación y Docencia  
División de Investigación y Desarrollo --  
Experimental.  
Palo Alto, México, D.F. C.P. 11000  
Apartado Postal 41 - 740 C.P. 05110  
Teléfonos: 570-24-99 Ext. 167-168-169  
570-17-79 Directo  
570-16-79 Directo