

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"CARACTERIZACION DE LAS PECTINAS DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) Y POSIBILIDADES DE SU USO EN ALIMENTOS"

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO DE ALIMENTOS

p r e s e n t a

URSULA MEJIA MELGAR



México, D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA 1998

LIBROS CON
FALLA DE ORIGEN

26 4340



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Francisca Aída Iturbe Chiñas.
Vocal: Prof. Hermilo Leal Lara.
Secretario: Prof. Hugo Rubén Carreño Ortíz.
1er suplente: Prof. Felipe de Jesús Rodríguez Palacios.
2do suplente: Prof. Rodolfo Cuervo Coss.

TRABAJO DESARROLLADO EN EL LAB. 323, CONJUNTO "E" DE LA
FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.

ASESOR.


Francisca Aída Iturbe Chiñas.

SUSTENTANTE.


Ursula Mejía Melgar.

A mi mamá, Rosa, por todo el amor que compartimos y todo lo demás.

A mi papá, Alberto, por haber aceptado el reto de serlo. Gracias.

A mis hermanos, Alberto y Priscila, por todo lo que me han enseñado y por sus sonrisas.

A mi tía Nora, por seguir siendo un ejemplo de vida.

Con toda mi admiración a mis Abuelitos Pali, Leo, Clara y Chucho.

Dem, porque tu eres el otro personaje de la noche con el que voy de la mano por la vida. Por el gusto de habernos encontrado.

AGRADECIMIENTOS.

A la M. en C. Fanny Iturbe por su infinita paciencia durante la elaboración de este trabajo, pero sobre todo por ser el mejor ejemplo del "Amor a la Profesión". Gracias.

A la M. en C. Rocío Santillana por su apoyo y paciencia para la realización de la Cromatografía de Gases.

Al M. en C. Luis Medina por su apoyo para realizar el análisis reológico.

A la Dra. Adela Rodríguez y al Dr. Roberto Arreguín del Instituto de Química por todas sus enseñanzas y por el apoyo para realizar la determinación de peso molecular.

Al Departamento de Cómputo del Colegio Madrid: Lucía, Severino, Rocío, Mayra, Isabel y muy especialmente a Laura, por todo su apoyo.

Por supuesto, a mis mejores amigos: Martha, Lilliana, Tayde, Aris, Karla, Marcela, Karina, Fabiola, Dulce, Chema, Andrés, Jimmy, Rafa, Lucero, Ericka y a todas las "madrileñas", por lo que hemos construido.

Al Colegio Madrid, por su formación a lo largo de mi vida.

**Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo del programa
Fundación UNAM, Iniciación a la investigación**

ÍNDICE

1.RESUMEN	1
2.INTRODUCCIÓN	2
3.OBJETIVOS	4
4.HIPÓTESIS	5
5.GENERALIDADES	6
5.1 Aplicaciones de las pectinas.	6
5.1.1 Las pectinas en la industria alimentaria.	6
5.1.2 Otras aplicaciones de las pectinas.	8
5.2 Propiedades funcionales de las sustancias pécticas.	8
5.2.1 Las pectinas como agentes gelificantes.	8
5.2.2 Interacciones con otros polímeros.	14
5.2.3 Modificación de las pectinas.	15
5.2.4 Aspectos legales en relación con las pectinas.	16
5.3 Generalidades sobre las pectinas.	17
5.3.1 Características generales sobre las sustancias pécticas.	17
5.3.2 Obtención general de las sustancias pécticas:la materia prima y sus características.	18
5.3.3 Nomenclatura utilizada para designar a las sustancias pécticas.	20
5.4 Caracterización química de las pectinas.	22
5.4.1 Obtención del material.	22
5.4.2 Caracterización.	24
5.4.3 Textura y viscosidad de las sustancias pécticas.	26
5.5 Características de las sustancias pécticas.	28
5.5.1 Clases de pectinas de acuerdo a sus características de extracción.	28
5.5.2 Estructura y características físicas y químicas de las pectinas.	29
5.5.3 Sistemas de interacción.	34
5.5.4 Degradación.	37

5.6 La flor de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).	43
5.6.1 Características de la planta.	43
5.6.2 Historia de su cultivo.	44
5.6.3 El cultivo en México.	45
5.6.4 Estudios sobre la flor de jamaica y su uso en alimentos.	45
6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.	47
6.1 Técnica de extracción del material péctico a partir de los concentrados de la flor de jamaica.	47
6.2 Determinación de pectinas (ac. D-galacturónico) en el material insoluble en EtOH.	48
6.3 Composición.	48
6.3.1 Determinación de cenizas en el material pectico.	48
6.3.2 Determinación de proteínas en material péctico.	48
6.3.3 Determinación de azúcares neutras asociadas a la cadena.	49
6.4 Determinación del grado de acetilación.	49
6.5 Determinar el grado de metoxilación de las pectinas.	49
6.6 Determinación del peso molecular.	50
6.7 Determinación de las características de textura y viscosidad.	51
7. RESULTADOS.Y DISCUSIÓN.	52
7.1 Extracción a nivel laboratorio	52
7.2 Determinación de pectinas (Ac. D-galacturónico)	55
7.3 Análisis de la composición.	56
7.3.1 Detrminación de cenizas en material péctico.	56
7.3.2 Determinación de proteínas en material péctico.	56
7.3.3 Determinación de azúcares neutras asociadas a la cadena.	56
7.4 Determinación del grado de acetilación.	58
7.5 Determinación del grado de metoxilación.	59
7.6 Determinación del peso molecular.	61

7.6 Determinación del peso molecular.	61
7.7 Determinación de las características de gelificación y viscosidad.	61
7.8 Tabla comparativa de resultados.	64
8. CONCLUSIONES.	70
9. RECOMENDACIONES	72
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	73
ANEXO 1. Técnicas utilizadas para la cuantificación de % de ácido D-galacturónico.	78
ANEXO 2. Técnicas para la determinación de azúcares neutros.	80
ANEXO 3. Preparación de muestras y cálculos para la determinación del % de ácido acético.	81
ANEXO 4. Recuperación de pectinas con sales de aluminio.	83
ANEXO 5. Preparación de muestras para cromatografía de gases.	84
ANEXO 6. Preparación de las soluciones de pectina para evaluación reológica.	85
Figura 1. Aplicaciones de las pectinas según su grado de metoxilación.	7
Figura 2. Estructura de las zonas de interacción de un gel de pectinas de alto metoxilo.	9
Figura 3. Representación esquemática del modelo de cartón de huevo.	10
Figura 4. Estructura general de las sustancias pécticas.	30
Figura 5. Reacciones de degradación de las pectinas en medios ácidos.	39
Figura 6. Reacciones de degradación de las pectinas en medio alcalino.	40
Figura 7. Acción de las enzimas pécticas sobre las uniones de las pectinas.	43
Figura 8. Cromatograma de metanol.	60
Figura 9. Curvas de viscosidad.	63

1. RESUMEN.

Se determinó la mejor técnica de extracción de las pectinas de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) a partir de un concentrado para preparar bebidas refrescantes, utilizando etanol para su precipitación, se obtuvo un rendimiento cercano al 10% en base seca, con base en el peso de la flor. Las pectinas obtenidas se caracterizaron fisicoquímicamente y se compararon contra una pectina cítrica comercial evaluada de la misma manera. La preparación obtenida presentó los siguientes valores: 72.18% de ácido D-galacturónico, 12.77% de cenizas, 3.99% de proteína, 6.99% de azúcares neutros asociados a la cadena reportadas como % de arabinosa. La pectina extraída presentó valores de 4.83% de acetilación y 48.75% de metoxilación, con un peso molecular de 36,000 a 40,000 daltons. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis comparativo de acuerdo con los valores reportados para pectinas cítricas comerciales, pectinas de betabel, pectinas de girasol y los valores encontrados para la pectina cítrica evaluada; se sugirió la posibilidad de la aplicación de las pectinas de la flor de jamaica como agentes estabilizantes de emulsiones y espumas, así como agentes encapsulantes o retenedores de compuestos de sabor y aroma en los alimentos.

2. INTRODUCCION.

En un intento de mejorar las condiciones económicas del municipio de San Pedro Atoyac, en la Costa Chica de Oaxaca, la coordinación de Sociología de la Facultad de Ciencias Políticas de la UNAM y el Instituto Nacional Indigenista, han creado un programa para el mejor aprovechamiento de los recursos naturales de la comunidad, impulsando el cultivo de algunos productos, incluyendo la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

Ante esta perspectiva, en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, de acuerdo con las necesidades de los campesinos, se estableció el proyecto APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA FLOR DE JAMAICA, dentro del cuál se consideró la posibilidad de utilizar los cálices (flor) de jamaica para la elaboración de concentrados.

Durante el desarrollo de esta alternativa, se detectó una cantidad apreciable de compuestos con capacidad para formar geles, extraíbles de la flor qué, dadas sus condiciones de obtención se supuso que se trataría de sustancias pécticas, que representan un subproducto en el proceso de elaboración de los concentrados.

Las pectinas son carbohidratos no digeribles constituyentes de la pared celular de los vegetales; por su capacidad de formar geles estables y de actuar como agentes espesantes y estabilizantes su demanda por parte del sector alimentario y farmacéutico se ha incrementado notablemente.

La utilización que se de a un tipo de sustancias pécticas en particular depende de sus propiedades funcionales, directamente relacionadas con sus características químicas, por lo que es fundamental la caracterización de su estructura y propiedades para su correcta aplicación.

Con el desarrollo de este trabajo experimental se llevó a cabo la caracterización de las pectinas que se obtienen durante el proceso de elaboración de los concentrados de la flor de jamaica para proponer su utilización en la producción de alimentos.

3. OBJETIVOS.

Determinar las características fisicoquímicas de las pectinas obtenidas como un subproducto durante la elaboración de concentrados de la flor de jamaica, y proponer su utilización dentro de la industria alimentaria.

Los objetivos particulares planteados fueron:

- Extraer las pectinas, a partir de los concentrados de la flor de jamaica
- Determinar el porcentaje de sustancias pécticas (ácido D-galacturónico) en el material insoluble en etanol.
- Determinar la composición de las pectinas de la flor de jamaica (ceniza, proteína, azúcares neutros y ácido D-galacturónico).
- Caracterizar químicamente las pectinas de la flor de jamaica (grado de metoxilación, grado de acetilación, peso molecular).
- Determinar las características reológicas de las pectinas de la flor de jamaica.
- De acuerdo con los resultados anteriormente señalados, establecer los lineamientos para el aprovechamiento de las pectinas de la flor de jamaica en alimentos.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Si la pectina de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) presenta características fisicoquímicas adecuadas, podrá utilizarse como aditivo alimentario, con las mismas propiedades funcionales que las pectinas comerciales.

5. GENERALIDADES.

5.1 Aplicaciones de las pectinas.

5.1.1 Las pectinas en la industria alimentaria.

Por la naturaleza de las sustancias pécticas, las primeras aplicaciones en el campo de alimentos hacen referencia a las mermeladas, jaleas y productos afines para mejorar condiciones de textura y firmeza así como para la estandarización del producto final, aprovechando su capacidad para formar geles de diversas características, además de ser un componente natural de las frutas y otros vegetales que se utilizan como materia prima en la elaboración de este tipo de conservas, siendo las pectinas de alto metoxilo las que han presentado la mayor variedad de aplicaciones para los productos con alto contenido de azúcar (May 1992).

Con el creciente desarrollo de los productos bajos en azúcar, las pectinas de bajo metoxilo han representado la alternativa más viable para la elaboración de productos gelificados con bajo contenido de azúcar: jaleas, mermeladas y productos de confitería bajos en calorías son algunos de los productos que pueden elaborarse a partir de sustancias pécticas con características de formación del gel específicas (May 1992).

Las posibilidades de aplicación de las pectinas en la industria de alimentos han aumentado conforme el estudio de las propiedades químicas de estos carbohidratos ha permitido predecir su comportamiento de acuerdo con sus características estructurales y de reactividad, actualmente se utilizan en los rellenos para pays, flanes y otros productos de panadería, como espesantes de bases para yoghurts y otros productos lácteos con sabores, como glaseados, productos de confitería, postres y postres congelados, frutas reestructuradas, como espesantes de salsas y jarabes, así como en jugos y refrescos dietéticos, etc. (May 1992, Walter 1991).

Algunas aplicaciones que se han sugerido recientemente para las pectinas con bajo poder gelificante, como el caso de las pectinas de betabel, radican en su capacidad de establecer interacciones con los componentes de sabor y aroma de algunos productos alimentarios. Se ha estudiado el considerable aumento en la retención de ácidos grasos en productos congelados, lo cuál puede ser de gran interés para la industria láctea (McPeack et al 1987). De igual manera, se han evaluado las posibilidades de actuar como agentes estabilizantes de emulsiones (Kratschnov et al 1982) y como estabilizantes de espuma, específicamente en el caso de la cerveza (Bernard et al 1981), obteniéndose en ambos casos resultados significativos para la aplicación del material péctico para mejorar las características de los alimentos. Las principales aplicaciones de las pectinas según su grado de metoxilación se presentan en la figura 1.

De acuerdo con las características químicas de las pectinas, se pueden generar nuevas alternativas de uso, por lo que el conocimiento de su estructura y propiedades químicas es fundamental para el completo aprovechamiento de estas sustancias que, representan en muchos casos productos de desecho o subproductos de industrias conserveras que pueden ser explotados con el adecuado conocimiento del material en cuestión.

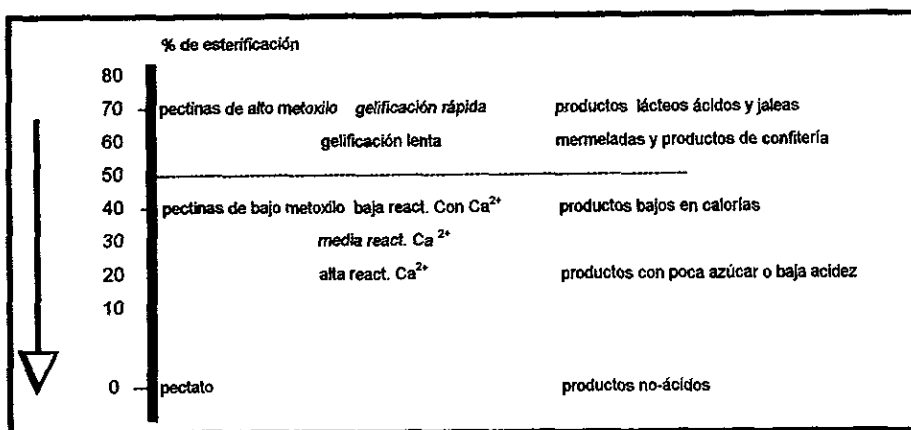


Figura 1. Aplicaciones de las pectinas según su grado de metoxilación.

Otras aplicaciones de las pectinas.

Las pectinas se han producido con fines comerciales desde principios del siglo XX, primero como un extracto líquido y actualmente como un polvo refinado de alta pureza. Dadas las características fisicoquímicas de estas macromoléculas los usos que pueden dárseles han aumentado con el creciente desarrollo de las diferentes industrias, quizá por sus características como componentes naturales de los alimentos y por la aceptación de la FDA como aditivos alimentarios, sus principales aplicaciones se encuentran regidas por la industria alimentaria, pero es importante señalar que la industria farmacéutica recurre frecuentemente a las pectinas como agentes espesantes y estabilizantes, además de utilizarse con finalidades farmacéuticas específicas, de tratamiento contra la diarrea, como agentes coagulantes y antihemorrágicos, etc. (Towle y Christensen 1973). Algunos autores han reportado la aplicación de las pectinas como agentes reductores del colesterol en el organismo y como agentes de ayuda en los tratamientos para la diabetes (Walter 1991). Existen además distintas aplicaciones en el ámbito de la industria cosmética, en cremas para rasurar, en jabones, en productos contra el acné, etc. (Walter 1991).

5.2 Propiedades funcionales de las sustancias pécticas.

5.2.1 Las pectinas como agentes gelificantes.

Las pectinas son capaces de conformar estructuras tridimensionales produciendo geles estables cuando el medio es adecuado y dependiendo de las características químicas de la pectina empleada, siendo directamente proporcional al peso molecular y de forma inversa al grado de metoxilación.

Cuando las pectinas son de alto metoxilo (50-80% de esterificación), forman geles fuertes si el pH se ajusta entre 2.0 y 3.5 para prevenir la ionización de los grupos carboxilo y la repulsión de las cargas, se requiere de una concentración de azúcar cercana al 60-65% para disminuir la actividad acuosa y aumentar el contenido de sólidos totales, con lo que se minimizan las interacciones del solvente con la pectina y permite la formación de la red tridimensional por las interacciones hidroxilo-hidroxilo, carboxilo-carboxilo y carboxilo-hidroxilo, la red se forma mediante puentes de hidrógeno y se estabiliza por interacciones hidrofóbicas (Bowers 1992) como se muestra en la figura 2.

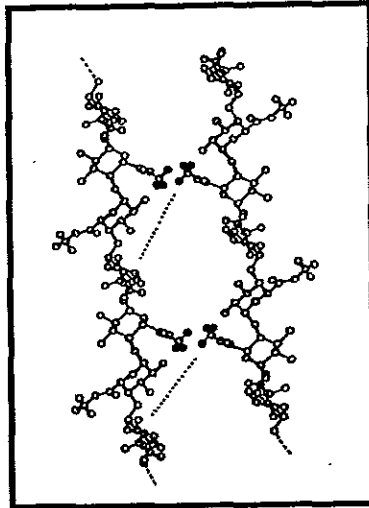


Figura 2. Estructura de las zonas de interacción de un gel de pectinas de alto metoxilo como se detecta por difracción de rayos X. Los átomos de hidrógeno de los grupos metilo hidrofóbicos están representados como • y los puentes de hidrógeno por las líneas punteadas.

Las pectinas con un porcentaje de esterificación menor al 50%, pectinas de bajo metoxilo, son capaces de formar geles estables en ausencia de azúcar, pero con la presencia de cationes divalentes en el medio, donde la red tridimensional está conformada por dos cadenas poligalacturónicas que interactúan, por acción de los cationes divalentes, bajo el modelo de "cartón de huevo" (figura 3), ya que permiten la interacción cruzada de las cadenas (Bowers 1992).

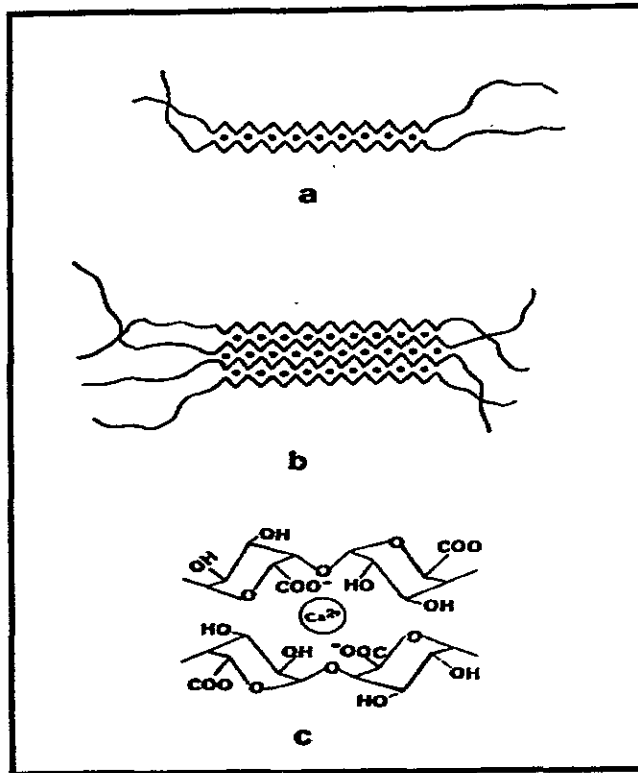


Figura 3. Representación esquemática del modelo de cartón de huevo, a) dímero de "cartón de huevo", b) agregación de dímeros, c) cavidad del "cartón de huevo".

La capacidad de una pectina para formar un gel bajo condiciones adecuadas depende además del contenido de cenizas, de los azúcares neutros asociados a la cadena, de la proporción de grupos acetilo, del peso molecular de las sustancias pécticas presentes y del pH del medio (Fishman et al 1980). Cuando el contenido de cenizas es alto (más de 5% en base seca), se puede modificar la capacidad para formar gel por la imposición de una fuerza iónica en el medio de disolución de la pectina (Miyamoto et al 1992). En el caso de los azúcares neutros, generalmente las sustancias pécticas que de manera natural presentan una cantidad importante de arabinosa, ramnosa, xilosa, galactosa, entre otras, presentan una capacidad de gelificación menor que aquellas que no

presentan azúcares neutros asociados a su estructura, ya que generan un impedimento estérico, además de impedir la interacción de los grupos que generan la estructura tridimensional en un gel por la sustitución en los mismos (Miyamoto et al 1992). Roboz y Van Hook (1946) señalaron que la presencia de grupos acetilo impiden la formación de gel en las pectinas de betabel. Phippen et al (1950) demostraron que al introducir grupos acetilo a una de cada ocho unidades de ácido galacturónico, se elimina totalmente la capacidad para formar gel en las mismas; una hidrólisis parcial de los grupos acetilo de la cadena reestablece la capacidad de gelación de la pectina (Phatak et al 1988). Cuando las pectinas presentan pesos moleculares bajos, la capacidad de gelificación disminuye considerablemente (Towle y Christensen 1973).

El uso que pueda darse a estas sustancias en la formulación de alimentos depende entonces de sus características químicas; el grado de esterificación que presente en los grupos carboxilo del ácido galacturónico que las forma, definirá las condiciones bajo las cuales son capaces de establecer las redes tridimensionales que definen las características del gel. Debido a sus propiedades gelificantes, el uso más importante de las pectinas en la industria alimentaria está en la fabricación de mermeladas y productos similares.

El valor para las soluciones y extractos en polvo de pectina comerciales que determinan la formación del gel puede expresarse comercialmente de diferentes formas. Se han ideado métodos para expresarlo basado en la proporción de pectato cálcico, pero este número indica solamente la cantidad de ácido pectínico y no tiene en cuenta los grupos metoxilo y los arabinos y otros azúcares asociados a la cadena, sin embargo ha resultado más apropiado, desde el punto de vista comercial, el ensayo por precipitación con alcohol o acetona. Treinta mililitros de solución de pectina se mezclan con diez mililitros de alcohol al 95%, y el vaso que contiene la mezcla se coloca en baño de hielo. La pectina de buena calidad debe producir una jalea firme al cabo de una hora. La pectina

inferior produce jaleas semilíquidas o de consistencia débil. La viscosidad de una solución de pectina es otro índice para apreciar su poder gelificante **(Rauch 1987)**.

Las propiedades que determinan el poder para la formación de gel en la pectina se expresan en grados USA/SAG, y representan el peso de azúcar en libras necesario para que una libra de pectina cuaje una jalea de consistencia estandar. La determinación del grado de la pectina se hace normalmente por comparación del gel formado por la jalea evaluada contra una muestra de pectina estandarizada. Varios instrumentos de ensayo se han ideado, basados en diferentes principios para la estandarización de las pectinas de uso comercial; en algunas fábricas se utiliza el probador de jalea B.A.R. para medir la rigidez del gel de pectina **(Rauch 1987, IFT Comitée 1959)**.

La temperatura a la que empieza a cuajar una jalea estándar se conoce como temperatura de cuajado. La temperatura y el grado se determinan normalmente sobre la base del 68.5% de sólidos solubles y a un valor de pH de 3.3. La consistencia de una jalea puede ajustarse aumentando o disminuyendo la cantidad de pectina en la misma. Se puede obtener una jalea muy fuerte, con una alta temperatura de cuajado, bajando el pH o aumentando el contenido de sólidos solubles de la mezcla **(Rauch 1987)**. Inicialmente se consideró un grado de 100 como estándar, pero el avance tecnológico ha implicado la estandarización para pectinas con grado 150, actualmente la estandarización de las pectinas se lleva cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos por el International Food Technology Committee en 1959 **(Towle y Christensen 1973, IFT Comitée 1959)**.

Un segundo factor importante para la determinación del grado de una pectina es el tiempo de formación del gel, que se define como el tiempo transcurrido desde el momento en que se han fijado las condiciones óptimas de gelificación de una pectina y aquel en el que la formación del gel ha comenzado.

Este lapso es importante por varias razones, industrialmente representa el tiempo disponible para el envasado de las jaleas o productos gelificados en sus contenedores y evitar que el gel se forme con el producto aún en el equipo de procesado (Towle y Christensen 1973). A continuación se presenta una tabla de las características típicas de las pectinas comerciales en donde se resumen los parámetros discutidos y se indica la propiedad funcional que se explota para la aplicación recomendada (tabla de información proveniente de Mexpectin M.R. de Grindsted de México, folleto informativo para el consumidor.):

Designación	Grado USA-SAG	Valor de pH en solución 4%	Tiempo de gelificación (s)	Grado de metoxilo típico	Dosis	Función	Aplicaciones
Extra slow set	150+/-5	2.7-3.2	280-330	58-62	1-2.5%	Agente gelificador	Jaleas de fruta, confitería, rellenos.
Slow set	150+/-5	2.7-3.2	175-225	63-67	0.2-0.7%	Gelificación relativamente lenta; permite el relleno en envases grandes a temperatura y tiempos de envasado largo.	Conservas, jaleas o mermeladas de todo tipo. Recipientes abiertos o al vacío.
Medium rapid set	150+/-5	2.8-3.3	90-120	68-72	0.2-0.6%	Estabiliza la estructura de gelificación a la temperatura de horneado.	Mermeladas y jaleas para panadería, rellenos.
Rapid set	150+/-5	2.8-3.3	<110	71-75	0.2-0.5%	Gelificación rápida a temperaturas altas	Bebidas de fruta concentradas.
Extra slow set buffered	100 +/-5	aprox 4	aprox. 600	58-62	2-3%	Agente gelificador.	Confitería o jaleas de relleno.
No aplicable	---	2.8-3.3	No aplicable	70-75	0.05-0.1%	Mejora el cuerpo y la palatabilidad	Zumos de fruta y otras bebidas de fruta.
No aplicable	---	2.8-3.3	No aplicable	70-75	0.2-0.5%	Estabiliza las proteínas de leche durante el tratamiento de calor.	Bebidas de leche acidulada con zumo de fruta

5.2.2 Interacciones con otros polímeros.

La pectina es un hidrocoloide cargado negativamente, y como tal interactúa con polímeros con carga positiva al estar en solución. La interacción con proteínas por abajo de su punto isoeléctrico establece las bases para entender el mecanismo que permite a las pectinas estabilizar una mezcla de leche ácida y leche de soya. Las sustancias pécticas interactúan además con gelatina en valores bajos de pH, es importante que cuando se usen mezclas de pectina y gelatina en algún sistema, se verifique y controle el valor de pH y la fuerza iónica para prevenir reacciones no favorables **(May 1992)**.

Un tipo de interacción diferente puede ser observado entre las pectinas con alto grado de metoxilación y el alginato con alto contenido de ácido guturónico. Al mezclarlos en iguales proporciones producen un gel en el que ninguno de los dos agentes gelifica por separado, sino que forma un conglomerado en valores bajos de agentes gelantes y sólidos de azúcar. Sin embargo estas interacciones son muy susceptibles a las modificaciones en la acidez y a la adición de iones calcio aunque sea en pequeñas cantidades. Solamente algunos productos comerciales han utilizado esta interacción, quizá por la presencia de calcio en la mayoría de los alimentos y el bajo punto de fusión de los geles obtenidos **(May 1992)**.

La capacidad de las pectinas como agentes estabilizadores de emulsiones agua-aceite y sus excelentes propiedades de formación de películas, han sido factores determinantes para la aplicación de las pectinas en las industrias textil y papelería **(May 1992)**. En la industria cigarrera, las pectinas se utilizan para producir cigarros con la capacidad de autoconsumirse, además de su aplicación como pegamento para el papel empleado **(Walter 1991)**. Las pectinas han demostrado ser agentes útiles para la formación de membranas para procesos de ultrafiltración y electrodiálisis **(Towle y Christensen 1973)**.

5.2.3 Modificación de las pectinas.

La pectina recién extraída presenta normalmente un relativo alto grado de esterificación, cerca del 70 al 75% de los grupos ácidos en la molécula están esterificados naturalmente con metanol; este tipo de pectina es ideal para ser utilizada en la elaboración de mermelada y jalea tradicional, ya que genera una rápida velocidad de formación del gel, lo que evita que la fruta flote, sin embargo, la aplicación de las pectinas sobre otros productos requiere la preparación de las mismas para conferirles diferentes propiedades, entre ellos el tiempo de gelificación **(May 1992)**.

La pectina puede modificarse reduciendo el grado de esterificación, generalmente mediante un proceso de hidrólisis **(May 1992)**.

La modificación a la pectina puede llevarse a cabo de diferentes maneras, sobre la materia prima directamente, durante el proceso de extracción, en el extracto concentrado, o sobre el precipitado húmedo. Un proceso alternativo se establece con el uso de álcalis en bajas temperaturas, pectinestearasas purificada o amoníaco, si se usa amoníaco algunos de los grupos éster se convertirán en grupos amido ácidos (-CONH₂) produciendo una pectina amidada **(May 1992)**.

Si el peso molecular se reduce hasta un 60% de esterificación, la pectina será de formación de gel lenta, y es capaz de formar un gel solamente en sistemas con alto contenido de azúcar. Bajo condiciones similares, el gel se formará mas lentamente o a menor temperatura que con la pectina original de formación de gel rápida. Sin embargo, sera capaz de tolerar altas concentraciones de azúcar y/o valores de pH bajos. Una vez que el grado de esterificación de una pectina es menor al 50%, las pectinas se consideran de bajo metoxilo, y favorecen las interacciones con iones calcio para la formación de

geles. Siendo capaces de formar geles progresivamente bajo condiciones con menor proporción de sólidos solubles totales, con la cantidad adecuada de calcio en solución. Las pectinas amidadas corresponden en su mayoría al grupo de las pectinas de bajo metoxilo y tienen la ventaja de soportar fluctuaciones en la cantidad de iones calcio presente **(May 1992)**.

Para la elaboración de mermeladas y jaleas y bajo las concentraciones usuales, las pectinas con alto grado de metoxilación inducen modificaciones indeseables en el sabor y la intensidad del producto, mientras que las pectinas con bajo grado de metoxilación inducen muy pocas modificaciones en cuanto al sabor del mismo, independientemente de las consideraciones que deban hacerse respecto a su textura **(Guichard et al 1991)**.

5.2.4 Aspectos legales en relación con las pectinas.

La pectina comercial es regulada como un aditivo alimentario en la mayoría de los países, y es definida como tal por la Comisión de Codex Alimentarius de las Naciones Unidas, por la Comunidad Europea, así como en los Estados Unidos. Estos organismos regulan en función de la pureza y las legislaciones pueden verse modificadas en este sentido, por lo que se sugiere consultar las últimas versiones de las publicaciones correspondientes, dependiendo de cada caso **(May 1992)**.

En general las sustancias pécticas son totalmente aceptadas desde el punto de vista toxicológico, tanto las pectinas como las pectinas amidadas (pectinas "colectivas") tienen un valor aceptable de ingesta diaria (acceptable daily intake value ADI) no especificado por los comités internacionales expertos del JECFA (Joint Food and Agriculture Organization World Health Organization Experts Committee on Food and Additives) ni por el Comité Científico de la Comunidad Europea **(May 1992)**.

En términos de su uso, la pectina es permitida en un amplio rango de productos alimentarios, sin embargo, algunas regulaciones locales pueden variar y deben ser consultadas. La mayoría de las restricciones derivan de la necesidad de evitar los riesgos de una decepción del consumidor, por ejemplo, la posibilidad de obtener una menor cantidad en la cantidad o calidad de la fruta de un producto determinado, y no por efectos toxicológicos **(May 1992)**.

Sin embargo, no debe asumirse la aplicación de sustancias pécticas sin considerar que el uso de grandes cantidades de pectina por cuestiones nutricionales además de su uso como aditivo no se considera dentro de la legislación, y podría generar condiciones adversas en ciertos consumidores, por lo que se debe considerar además la norma de etiquetado local **(May 1992)**.

Quizá el único riesgo de las pectinas sobre el cuál su aplicación es regulada, corresponde a la formación de metanol que se deriva de la hidrólisis en solución, existen estudios para determinar la vida de anaquel de los productos de acuerdo con la degradación de las sustancias pécticas presentes **(Olea et al 1984)**.

5.3. Generalidades sobre las pectinas.

5.3.1 Características generales sobre las sustancias pécticas.

Las pectinas son un grupo heterogéneo de polisacáridos con alto peso molecular y presentan importancia en alimentos, no solo porque son las responsables de la textura o consistencia de muchos productos en forma natural, sino también porque tienen un amplio uso como agentes gelificantes o espesantes **(May 1992)**.

Las pectinas son uno de los principales constituyentes de la pared celular (representan cerca de una tercera parte, en base seca), de los vegetales y de las regiones intracelulares ya que se depositan principalmente en la pared primaria y en la lamina media, siendo los tejidos meristemático y parenquimático particularmente ricos en sustancias pécticas. En los tejidos vegetales tanto de las plantas dicotiledóneas como en algunas monocotiledóneas, las sustancias pécticas se combinan con la hemicelulosa ejerciendo una función de "cemento intracelular". Durante la vida fisiológica de los vegetales y en los productos de transformación y almacenamiento de los productos derivados, se producen cambios en el contenido en pectinas y en su estructura que en gran medida, determinan las modificaciones que se producen en su textura (Carbonell et al. 1990, Walter 1991, Fennema 1985).

En la fruta inmadura, como en la mayoría de los tejidos vegetales, la mayor proporción de material péctico se encuentra como protopectina, que es insoluble en agua y, conforme las frutas alcanzan mayores estadios de madurez, la protopectina se transforma gradualmente en una forma más soluble en agua, (Nelson et al 1973), de hecho, representan uno de los polisacáridos de la pared celular con mayor capacidad para disolverse en agua (Walter 1991).

5.3.2 Obtención general de las sustancias pécticas: la materia prima y sus características.

A pesar de la abundancia de las sustancias pécticas en el Reino Vegetal, solamente algunos materiales han sido utilizados para la obtención de pectinas comerciales como aditivos para la industria alimentaria; una de las razones que explican este hecho es que una gran proporción de las sustancias pécticas presentes en la naturaleza no presentan las propiedades funcionales necesarias para su aprovechamiento, especialmente la habilidad para formar geles en medios ácidos y azucarados, que ha sido uno de los requerimientos en las

pectinas comerciales hasta hace poco; algunos factores que inhiben esta capacidad son la presencia de altas concentraciones de azúcares neutros asociados a la cadena polimérica o un alto grado de sustitución con grupos acetilo **(May 1992)**.

Es muy importante señalar que la industria de las pectinas se ha desarrollado como una industria de subproductos utilizando materiales de desecho de la industria alimentaria, especialmente de la producción de jugos de frutas y bebidas elaboradas a base de jugos de frutas, originalmente se comenzó la producción de pectinas utilizadas para formar geles, a partir de cáscaras y corazones de manzanas, o como conservadores al aplicarse para disminuir la actividad acuosa de un producto. Posteriormente se procedió a deshidratar el extracto para rehidratarlo cuando fuera necesario **(May 1992)**.

Actualmente las fuentes comerciales para la obtención de pectinas son las cáscaras de los cítricos y los desechos de la industria procesadora de manzanas. Algunos otros subproductos de la industria alimentaria que contienen cantidades significativas de pectinas son la pulpa del betabel y las cabezas (flores) de girasol, la pulpa de betabel es un subproducto de la industria azucarera. En tiempos de crisis, para suplementar los residuos de manzana como fuente de pectina, se ha recurrido al betabel para obtener sustancias pécticas, sin embargo su alto grado de acetilación y su relativo bajo peso molecular lo hacen un producto pobre para la mayoría de las aplicaciones, especialmente porque presentan poca capacidad para formar geles. Existe por el contrario, un uso potencial para las pectinas de betabel en las que los grupos metoxilo han sido cuidadosamente retenidos; actualmente se ha demostrado que las pectinas de betabel tienen una gran capacidad como emulsificantes en alimentos y pueden ser utilizadas para estabilizar emulsiones aceite-agua **(May 1992)**.

En el caso del girasol, existen dos problemas fundamentales para utilizar sus flores como fuentes de pectina, el primero es que el punto de madurez de la flor para llevar a cabo la colecta de la semilla para la extracción de aceite que es el producto principal, no corresponde al punto de madurez para la obtención de pectinas; además el grado de acetilación es incluso mayor que para las pectinas de betabel, sin embargo como presentan un peso molecular mayor, resulta factible desacetilarlo y mantener una capacidad de gelificación adecuada (May 1992).

La producción de pectinas depende de una gran cantidad de factores, incluyendo el acceso a la materia prima, agua, energía y efluente para desechos a un precio razonable. En contraste con la mayoría de los hidrocoloides, no se cultiva ninguna especie con la finalidad de producir pectinas, estas son producidas esencialmente a partir de materiales de desecho (May 1992).

En Europa, las plantas productoras de pectina, se han modificado hacia un aprovechamiento de las cáscaras de los cítricos como materia prima; lo cual ha llevado a un sistema de protección contra malas cosechas en una sola zona. Actualmente esta tecnología se ha visto aplicada por grandes compañías en países de alta producción de cítricos como México y Brasil (May 1992).

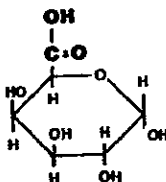
5.3.3 Nomenclatura utilizada para designar a las sustancias pécticas

Debido a la considerable confusión que puede suscitarse al nombrar a las diferentes sustancias pécticas, un comité de la American Chemical Society (1944) definió a este grupo de polisacáridos como a continuación se señala (Fennema 1985, Nelson et al 1973, Fogarty et al Keteszi 1965, Mc Cready 1970):

- sustancias pécticas: se refiere al grupo de carbohidratos complejos coloidales que se encuentran o se obtienen a partir de los vegetales y que contienen una gran proporción de unidades de ácido anhidrogalacturónico. Los grupos carboxilo del ácido poligalacturónico pueden estar parcialmente esterificados con grupos metoxilo, o bien, parcial o totalmente neutralizados con una o más bases.
- protopectina o pectina nativa es el nombre empleado para designar a las sustancias pécticas presentes en las plantas altamente esterificadas con grupos metoxilo, responsables de la textura dura en los vegetales inmaduros, insolubles en agua y que mediante una hidrólisis controlada produce pectinas.
- ácidos pectínicos es como se designa a las sustancias pécticas metiladas en menor grado que la protopectina, en su forma de sal son llamados pectinatos.
- ácidos pécticos es el nombre que se da a los ácidos poligalacturónicos que contienen una mínima o nula proporción de grupos metil-éster, en su forma de sal se llaman pectatos.
- pectina es el término utilizado para los ácidos pectínicos solubles en agua, con diferentes proporciones de grupos metoxilo como sustituyentes, que bajo ciertas condiciones del medio presentan la capacidad para formar geles. Cuando la proporción de grupos metoxilo sustituyentes es mayor al 50% se considera que se trata de una pectina de alto metoxilo y, por el contrario, si es menor al 50% se considera una pectina con bajo grado de metoxilación, esto determina sus características de gelificación.

Existen otros nombres relacionados con las estructuras pécticas que se refieren a las unidades monoméricas:

- ácido D-galacturónico, es un derivado de la D-galactosa, que tiene el átomo de carbono 6 oxidado hasta su forma ácida, su fórmula desarrollada se presenta a continuación:



- ácidos urónicos, son derivados de las aldosas que tienen en un extremo un grupo aldehído y en el otro extremo un grupo ácido, se representan por la fórmula general $\text{HOOC}(\text{CHOH})_n\text{CHO}$. Cuando el ácido poligalacturónico se fragmenta en sus unidades obtenemos ácido anhidrogalacturónico, como resultado de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos.

5.4 Caracterización química de las pectinas.

5.4.1 Obtención del material.

Es indispensable para caracterizar una pectina, primero extraerla y purificarla a partir de la materia prima; la extracción puede llevarse a cabo con agua, con soluciones quelantes o bien con tratamientos en medios ácidos o básicos. Una vez que la pectina ha sido extraída es necesario precipitarla en el medio en el que se encuentra soluble, para ello puede recurrirse al uso de etanol, o bien al uso de sales (Towle y Christensen 1973).

- **Extracción.**

Para extraer la pectina comercial, el bagazo de manzana y/o la cáscara de los cítricos ya sea húmeda o seca se calienta bajo condiciones controladas de

temperatura y pH en agua que contiene ácidos minerales. Es necesario utilizar un volumen grande de agua, ya que un punto crítico es la separación del extracto con la pectina de los sólidos restantes (May 1992, Carbonell et al 1990).

- **Precipitación:**

Muchas pectinas se separan actualmente por precipitación con etanol. Para que este proceso sea eficiente, el extracto de pectina debe estar suficientemente concentrado. Para evitar una degradación térmica de la pectina, este proceso se lleva a cabo en evaporadores al vacío. El extracto puede posteriormente ser sometido a dos procesos: puede ser mezclado con un alcohol adecuado como isopropanol, etanol o metanol, dependiendo del costo y la disponibilidad, o bien, puede ser procesado para modificar su grado de esterificación previo a la precipitación. El precipitado de consistencia gelatinosa se separa y debe ser sometido a otros tratamientos antes de secarse, tales como: sedimentación y decoloración; posteriormente debe molerse hasta un tamaño de partícula homogéneo, que después se estudia para determinar el grado de pureza y la fuerza del gel, para poder estandarizarla (Towle y Christensen 1973).

- **Purificación.**

En muchos casos es necesario eliminar del material péctico algunas sustancias acopladas a la cadena, como pueden ser proteínas, minerales o moléculas que confieren sabores, aromas o colores indeseables a la pectina para poder ser utilizada o evaluada, la técnica más común de purificación consiste en dializar la pectina contra agua destilada para eliminar algunas moléculas que pueden alterar sus propiedades. Si la pectina de manzana se produce para venderla en forma líquida, el extracto es tratado con carbón activado para eliminar algo de color, y posteriormente con una amilasa para eliminar el almidón presente. Una filtración posterior permite eliminar pequeñas partículas de pared

celular e impurezas solubles, con lo que se obtiene un extracto mas brillante (Towle y Christensen 1973).

5.4.2 Caracterización.

La caracterización química de las pectinas es un factor crucial para su correcta aplicación en el ámbito industrial, incluye: determinación del grado de metoxilación, peso molecular, proporción de azúcares neutros y grado de acetilación.

- grado de metoxilación.

De entre las determinaciones que incluye la caracterización fisicoquímica de un material péctico, el grado de metoxilación constituye una de las mas importantes, ya que las características de aplicación y uso dependen en gran medida del porcentaje de grupos metoxilo asociados a la cadena. Existen varias técnicas para la determinación del grado de metoxilación de las pectinas, los directos se fundamentan en cuantificar la proporción de enlaces éster y los indirectos en la determinación del metanol que se obtiene cuando los enlaces éster se han hidrolizado:

a) Métodos directos

-saponificación en medio acuoso y titulación (método volumétrico). Método de saponificación de Hinton (Hinton 1940, Reginald et al 1983).

-saponificación con dimetil sulfóxido. (Reginald et al 1983).

-separación por permeación en gel seguida de análisis de conductividad (Plöger 1992).

b) Métodos indirectos.

- oxidación reducción (ácido yodhídrico/ bromo) (**Towle y Christensen 1973**).
- hidrólisis básica y cuantificación de MeOH por GC (**Olea et al 1984**).
- uso de alcohol oxidasa para cuantificación de metanol posterior a hidrólisis (**Klavons et al 1986, Phatak et al 1988, Miyamoto y Chang 1992**).
- marcaje con C^{13} y RMN (**Barford et al 1986**).

- determinación del peso molecular:

El peso molecular del material péctico en estudio puede determinarse utilizando diversas técnicas, las mas utilizadas son la permeación en gel, comparando contra estándares de dextranas (**Walter 1991**), la osmometría de membrana (**Lexow et al 1981**) y caída de viscosidad después de hidrólisis parciales (**Walter 1991**), algunas otras técnicas sugeridas son la electroforesis, la ultracentrifugación, la microscopía electrónica, etc. (**Marshall et al 1984**).

- determinación de los azúcares neutros asociados a la cadena.

En general todas las técnicas de análisis de carbohidratos pueden aplicarse a la cuantificación de los azúcares neutros de las pectinas después de haberse llevado a cabo un proceso de hidrólisis, la caracterización puede llevarse a cabo por medio de una Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (**Phatak et al 1988**).

- determinación de grupos acetilo.

La mayoría de los investigadores reporta como técnica de análisis para el grado de acetilación, la cuantificación de ácido acético generado a partir de una hidrólisis controlada del material péctico, utilizando métodos comerciales **(Phatak et al 1988, Miyamoto et al 1992)**.

5.4.3 Textura y viscosidad de las sustancias pécticas.

Para la aplicación de las pectinas en alimentos es importante además estudiar las características de textura y viscosidad ya que de eso depende la funcionalidad de las sustancias pécticas.

La textura o consistencia de un producto se refiere al conjunto de los atributos físicos que incluyen la cohesión, la adhesión, la dureza, la viscosidad, la elasticidad y la gomosidad de un producto. Usualmente se utiliza el término de textura como sinónimo de fuerza del gel cuando se habla de gomas, proteínas y otros agentes gelificantes **(Walter 1991)**.

Se han realizado diferentes estudios para que la respuesta sensorial de la pectina vaya acorde con aquella que espera el consumidor. Se han desarrollado dos tipos generales de análisis: aquellos que destruyen la muestra o pruebas destructivas y aquellos en los que no hay pérdida del material, o pruebas no destructivas **(Walter 1991)**.

Es sabido que durante el procesamiento de los alimentos, así como durante su almacenamiento, las características de textura están sujetas a modificaciones que pueden ser, en algunos casos, de carácter irreversible, lo que ha hecho necesario el desarrollo de técnicas de análisis de textura en los alimentos **(Pons y**

Fiszman 1996). Sin embargo, las propiedades de textura de los alimentos pueden ser difíciles de medir debido al tamaño o forma de los productos, la mayoría de los análisis de ingeniería requieren geometrías o aditamentos específicos para cada determinación (**Vincent et al 1990**). Se han desarrollado tres tipos de pruebas para satisfacer las necesidades de análisis (**Bourne 1978**):

- Evaluaciones fundamentales: aquellas que son familiares a las técnicas de ingeniería más conocidas.
- Evaluaciones empíricas: aquellas que incluyen una variedad importante de análisis que aunque no han sido definidos cabalmente, presentan una interpretación útil en la correlación con la textura de los alimentos.
- Evaluaciones imitativas: aquellas que procuran igualar las condiciones del producto en la boca o en el plato.

Los métodos de análisis de textura han sido utilizados para evaluar diferentes tipos de geles en alimentos, los hidrocoloides más evaluados son las carrageninas, los alginatos, las gomas xantana y gelana, entre otros. Dado que las pectinas son ampliamente utilizadas como agentes espesantes, los análisis de viscosidad representan también un índice de aplicación para una sustancia péctica específica (**Walter 1991**).

El principio en el que se fundamentan los análisis de viscosidad se refiere a la relación que ésta guarda con la resistencia al flujo de una sustancia determinada frente a una fuerza aplicada. La técnica analítica más comúnmente utilizada es la de viscosimetría rotativa; los viscosímetros consisten usualmente en un cilindro rotativo que se introduce en un recipiente fijo que contiene la muestra a evaluarse. El rotor se hace girar a una velocidad programada utilizando un loop de retroalimentación muy sensible para mantener una velocidad exacta. La resistencia de la muestra al flujo genera un pequeño movimiento en la barra de torsión, el movimiento de deflexión generado es detectado por un traductor

electrónico capaz de interpretarlo como velocidad y torque en el material analizado (Manual del Reómetro marca Fisons, modelo HAAKE RV-20). La respuesta está definida para una temperatura única de establecida previamente a la cual trabaja el equipo, mantenida con un baño de agua a la temperatura de análisis constante; las muestras son atemperadas antes de evaluarse para que las condiciones sean homogéneas.

5.5 Características de las sustancias pécticas.

5.5.1 Clases de pectinas de acuerdo a sus características de extracción.

Las pectinas se han clasificado tradicionalmente de acuerdo a los procedimientos utilizados para extraerlas a partir de las paredes celulares, en general se distinguen tres tipos diferentes: las pectinas solubles en agua, que pueden extraerse con agua o con soluciones salinas diluidas; las pectinas solubles en medios con agentes quelantes, extraíbles con soluciones acuosas de agentes quelantes de calcio tales como EDTA (triacetato de etilendiamina) o hexametáfosfato y las protopectinas que pueden obtenerse con soluciones alcalinas o con ácidos calientes diluidos. La dificultad para extraer protopectina se debe a que las interacciones de la protopectina con la matriz de la pared celular solamente son sensibles a tratamientos básicos o ácidos bajo ciertas condiciones (Walter 1991).

La proporción de los diferentes tipos de pectinas varían considerablemente para distintos tipos de tejidos. Las pectinas solubles en agua y en medios quelantes, normalmente están compuestas por ácido galacturónico en su mayor proporción con algunos residuos de ramnosa (2%) y azúcares neutros (10-20%) mayoritariamente galactosa y arabinosa. La distribución así como la fracción de grupos carboxilos libres determinan las características de extracción de las pectinas. Las pectinas comerciales normalmente presentan fracciones de pectinas solubles en agua y en soluciones de agentes quelantes, pero la mayoría de los

azúcares neutros han sido removidos por un proceso de hidrólisis durante la extracción (Walter 1991).

Al separar las diferentes fracciones por el método de disolución fraccionada descrito por Rouse y Atkins (1955) se obtienen tres fracciones de las sustancias pécticas: la soluble en agua, que comprende las pectinas de alto metoxilo, la soluble en oxalato (u otro secuestrante de iones calcio), que incluye las pectinas de bajo metoxilo y la soluble en álcali o protopectina; algunos investigadores completan la disolución fraccionada extrayendo, además, la fracción soluble en ácido y la fracción soluble en una solución amortiguadora de acetato (Carbonell et al 1990).

La disolución fraccionada puede utilizarse para la determinación del contenido en pectinas totales al sumar los contenidos de cada fracción (Carbonell et al 1990).

5.5.2. Estructura y características físicas y químicas de las pectinas.

- Estructura.

Las pectinas están constituidas por polímeros que tienen como unidad estructural al ácido D-galacturónico unido mediante enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$; insertados a lo largo de la cadena urónica principal se encuentran unidades de ramnosa unidas mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ en el extremo reductor de la cadena y mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ en el extremo no reductor de la siguiente unidad urónica; las moléculas de ramnosa introducen un enroscamiento sobre la cadena principal que normalmente se presenta recta. Frecuentemente se presentan cadenas laterales a la ramnosa de arabanos, galactanos o arabinogalactanos, unidos mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Otros azúcares tales como ácido D-glucurónico, L-fucosa, D-glucosa, D-mannosa y D-xilosa pueden encontrarse presentes en las cadenas laterales (Walter 1991, Fishman et al 1984, Fogarty et al 1980).

Un factor importante en la caracterización química de las pectinas es el grado de esterificación (DE). Los grupos carboxilo de las unidades de ácido galacturónico se encuentran parcialmente esterificadas con metanol (Nelson et al 1973). A continuación se muestra la estructura general para las pectinas:

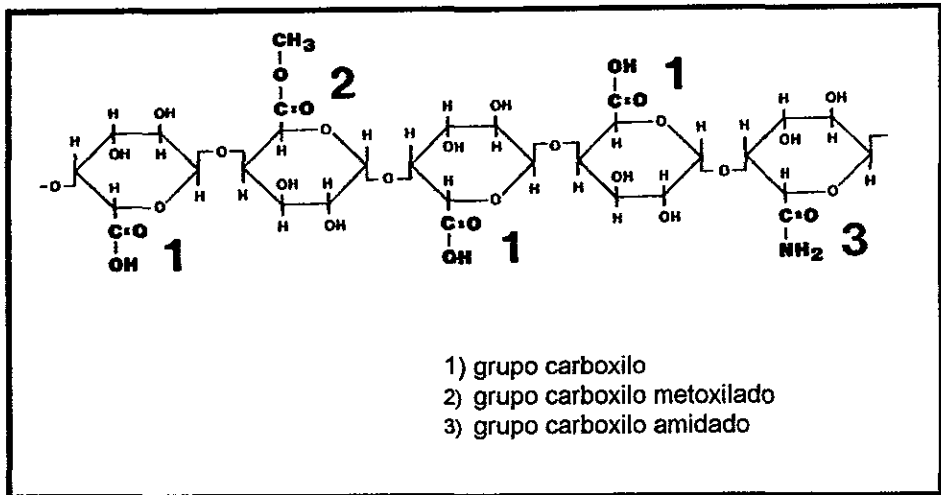


Figura 4. Estructura general de las sustancias pécticas.

Algunos grupos hidroxilos de carbono 2 y 3, pueden estar acetilados, variando proporcionalmente entre 0.1 y 4% de acetilación (**Fogarty et al 1980**), se ha sugerido que las pectinas comerciales no deben presentar proporciones mayores al 1% de sustitución por ácido acético para no alterar sus propiedades funcionales (**Nelson et al 1981**). Sin embargo, algunos autores reportan valores diferentes. Las pectinas provenientes de ciertas especies, tales como el betabel, presentan proporciones significativas de acetilación sobre los residuos urónicos. Para la zanahoria y el albaricoque se detectan valores similares de entre 7 y hasta 13%. Se ha demostrado que la acetilación ocurre en la posición C-3 de los residuos urónicos en las fracciones del polímero ricas en ramnosa (**Walter 1991**). Algunos valores específicos se muestran a continuación (**Nelson et al 1981**):

Fruta	% acetilación
chabacano	1.36
cereza	0.18
cítricos	0.24
frambuesa	0.25
fresa	1.43
betabel	2.50

El estudio sobre el peso molecular de las pectinas obtenidas a partir de diferentes frutos ha demostrado que su peso molecular puede fluctuar desde 10 000 hasta 300 000 o más daltons (**Fogarty et al 1980**), ejemplos de ello son:

Materia prima	peso molecular
manzana y limón	200,000 - 360,000.
manzana, ciruela y pera	25,000 - 35,000.
cítricos (varios)	23,000 - 71,000.
naranja	40,000 - 50,000.

Algunos autores señalan que las pectinas comerciales estandarizadas obtenidas a partir de cítricos y de manzana y cereza, presentan pesos que fluctúan alrededor de los 70 000 daltons (**Phatak et al 1988**).

Para el caso específico de las pectinas de betabel el peso molecular reportado es de 35,000 a 45,000 daltons (**Phatak et al 1988, Michel et al 1985**), sin embargo las variaciones encontradas durante los estudios se deben a las diferentes técnicas de extracción llevadas a cabo, ya que la fracción péctica extraída con cada disolvente es diferente (sección 5.5.1).

- **Propiedades físicas de las pectinas.**

Las pectinas son en su mayoría solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos, aunque en pequeñas proporciones pueden disolverse en los solventes orgánicos más polares como son la formamida, N,N-dimetilformamida mono y dimetilsulfóxido, y en algunos casos en glicerol caliente (**Fogarty et al 1980, Towle y Christensen 1973**). La solubilidad en agua esta determinada por el numero de grupos metoxilo, su distribución y el peso molecular del polímero, generalmente la solubilidad se incrementa conforme decrece el peso molecular y con el aumento de la proporción de los grupos metoxilo, además el pH de la solución, la temperatura, y el tipo y la concentración de las sales presentes así como moléculas orgánicas presentes, como la sacarosa, afectan

marcadamente la solubilidad de las sustancias pécticas (**Towle y Christensen 1973**). De acuerdo con la solubilidad de las pectinas se obtienen tres fracciones que se analizaron previamente de las mismas: la soluble en agua, la soluble en oxalato (u otro secuestrante de iones calcio), y la soluble en álcali (**Carbonell et al 1990**).

Las soluciones de pectina al 1 o 2% (w/v) son altamente viscosas; la viscosidad de las dispersiones de pectinas depende de varios factores. Los polisacáridos pécticos pueden ser precipitados a partir de las soluciones acuosas con solventes orgánicos miscibles en agua como etanol o acetona, también con polímeros básicos solubles en agua, con cationes divalentes, con detergentes cuaternarios y proteínas. La presencia de grupos acetilo disminuye la sensibilidad frente al calcio en el medio (**Towle y Christensen 1973**).

- **Propiedades químicas de las pectinas.**

Una de las características químicas mas importantes de las pectinas es su contenido de grupos carboxilo, que le imparten propiedades muy diferentes a las de otros carbohidratos que no tienen grupos ionizables. Los carboxilos de las pectinas pueden estar en forma no ionizada COOH a un pH menor de 3, en forma ionizada como COO^- a pH mayor a 3, o bien metilados como COOMe (**Nelson et al 1981**).

La presencia de grupos carboxilo libres genera que las soluciones de pectina presenten un valor de pH ácido; una solución de pectina al 1% sin solución buffer presenta un pH entre 2.7 y 3, las pectinas comerciales son estandarizadas para que tengan un pH de entre 3 y 4 (**Nelson et al 1981**).

5.5.3 Sistemas de Interacción.

Existen diversos sistemas de interacción que permiten a las pectinas establecer sistemas tridimensionales, los más importantes se describen a continuación (Walter 1991):

a) *Cohesión y formaciones por torceduras de las estructuras: la adhesión entre células en los tejidos vegetales requiere de componentes en las paredes primarias capaces de formar estructuras tridimensionales sólidas. La pectina es el polímero predominante en la lamela media de la pared celular de los vegetales con una concentración dentro de la estructura de entre 10 y hasta 30%. Bajo estas condiciones la pectina se comporta como un fuerte adhesivo estratificado entre las capas. Las propiedades de esta capa de pectina pueden ser consideradas como una combinación de líquido viscoso y una red de entrecruzamiento estable. El entrecruzamiento químico crea limitaciones o restricciones adicionales al movimiento. Dicho entrecruzamiento puede ser reversible tal como en el caso de las interacciones por puentes de hidrógeno o bien puede llegar a ser prácticamente irreversible como las uniones diferrúlicas. a medida que las uniones de entrecruzamiento aumentan, las moléculas de polímero se verifican más como una molécula efectiva única o estructura ramificada en la cual el peso molecular esta determinado únicamente por la suma de pesos de todas las cadenas poliméricas. El establecimiento de uniones entrecruzadas estables se ve favorecido por la participación de uniones que conforman estructuras tridimensionales mas complejas al girar sobre su propia estructura y torcerla, como madejas de hilo.*

b) *Entrecruzamiento por participación de iones calcio: Las pectinas con un bajo grado de esterificación (bajo metoxilo), pueden formar geles estables en ausencia*

de azúcar pero requieren la presencia de cationes divalentes, como el calcio, al formar entrecruzamientos moleculares.

La posibilidad para que los iones calcio formen complejos insolubles con las sustancias pécticas esta asociado con los grupos carboxilos libres en las cadenas pécticas. La formación de geles es mayor a medida que el grado de esterificación de las pectinas decrece. Las uniones establecidas por iones calcio incluyen otros grupos funcionales además de los grupos carboxilo, ya que se establecen fuertes interacciones entre el calcio y otros átomos de oxígeno en la pectina; y en algunos casos la formación de complejos involucra carbohidratos de carácter neutro y ácido (con una proporción importante de átomos de oxígeno) mediante sistemas de coordinación al utilizarse los orbitales vacíos del ion calcio.

Se ha propuesto un modelo denominado de "cartón de huevo" para el modelo estructural de formación de gel a partir de la coagulación de pectina inducida por la presencia de iones calcio. En dicho modelo, los iones calcio interactúan y se coordinan con los grupos con los oxígenos disponibles de dos cadenas adyacentes de las sustancias pécticas con bajo grado de esterificación generando un entrecruzamiento. Los entrecruzamientos formados por la presencia del ion calcio se hacen mas estables cuando existen varios entrecruzamientos vecinos.

Es sabido que el agua dura induce una mayor firmeza en los tejidos vegetales, este efecto se debe a la presencia de calcio en el agua. Las interacciones entre los iones calcio y la pectina de la pared celular juegan un papel muy importante al estabilizar la estructura de la pared. Además, se ha verificado que los tejidos vegetales blandos presentan concentraciones notablemente inferiores de calcio que los tejidos con mayor firmeza. En los tejidos vegetales, el 90% del calcio existente se encuentra ligado a los sistemas ya descritos.

Al conocerse la presencia del calcio en los tejidos vegetales, se han utilizado agentes quelantes (EDTA, CDTA y hexametáfosfato de sodio, entre otros) para remover el calcio de los mismos y mejorar la solubilidad del material péctico, con lo que se facilita su extracción. Cuando estos mismos agentes quelantes se aplican directamente sobre los tejidos en su estado natural, la cohesividad disminuye tan marcadamente que se puede evidenciar que las interacciones pectina-calcio son uno de los factores definitivos para la adhesión intercelular.

c)Entrecruzamiento por grupos ferrúlicos y cumáricos: Las posibilidades de establecer entrecruzamientos de los grupos éster de las sustancias pécticas, son mayores al contemplar la participación de grupos ferrúlicos y cumáricos que promueven la formación de gel en los polisacáridos. Los ácidos ferrúlicos tienen la capacidad de formar ésteres con los grupos hidroxilo de los azúcares neutros, el entrecruzamiento toma lugar con la participación de la peroxidasa y H_2O_2 , por la formación de enlaces covalentes entre los dos anillos fenil-ferrulicos. Los residuos ferrúlicos asociados a los polisacáridos son mayoritarios en ciertas especies. En el betabel, del 20 al 30% de los grupos pectico-ferrúlicos se encuentran unidos a los extremos no reductores de los residuos de arabinosa, y el resto a los extremos no reductores de los residuos de galactosa.

d)Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas: Existen dos tipos de interacciones no covalentes importantes en la asociación de las sustancias pécticas, los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, que juegan un papel muy importante en la formación de agregados cuando hay ausencia de agentes de formación de entrecruzamientos.

Existen varias posibilidades para formar puentes de hidrógeno a lo largo de la cadena de pectina, debido a sus grupos con oxígeno y los grupos hidroxilo. Se ha determinado que los puentes de hidrógeno se ven favorecidos por la conformación de los residuos urónicos adyacentes en las cadenas pécticas, mientras que los puentes de hidrogeno son débiles y fácilmente rompibles, una gran cantidad de ellos puede estabilizar los agregados poliméricos.

Los grupos metoxilo que se encuentran presentes de manera abundante en las pectinas de los tejidos vegetales pueden participar en sistemas de interacciones hidrofóbicas, las cuales estabilizan agregados al reducir el área de la superficie entre las regiones polares y no polares, con lo que se reduce además la energía del sistema.

e)Efecto electrostático: La repulsión electrostática juega un papel importante al reducir las agregaciones de la cadena, lo que se observa claramente en el efecto del pH y las concentraciones de electrolitos sobre la viscosidad de las soluciones en las cuales la pectina se comporta como un típico polielectrolito. En un rango de pH mayor a 7, existe una mayoría de cargas negativas sobre la pectina debido a la disociación de los grupos carboxilo. En concentraciones bajas de electrolitos casi es nula la protección de estas cargas, lo que genera la máxima repulsión de la cadena, un mínimo de agregación y su máxima elongación.

5.5.4 Degradación.

La molécula de pectina es fácilmente degradable, sin embargo, en contraste con otras gomas, la pectina es estable bajo condiciones ácidas, su estructura química la hace tener una tendencia para fragmentarse en condiciones ácidas extremas, especialmente bajo condiciones de temperaturas elevadas. Dado que la reacción puede ocurrir en cualquier punto de la cadena donde haya un grupo ácido

esterificado, una degradación mínima puede generar una gran caída en la viscosidad, en el poder gelificante y en otras propiedades funcionales. El nivel de degradación es menor con pectinas de bajo metoxilo y prácticamente nula en ácidos pécticos, el material completamente des-esterificado y sus sales, por lo tanto solamente los ácidos pécticos o las pectinas con muy bajos grados de esterificación pueden usarse en productos neutros, especialmente aquellos que van a ser procesados térmicamente **(May 1992)**.

En la naturaleza, las sustancias pécticas están altamente metiladas. Los procesos de desesterificación química o enzimática dan origen a pectinas debilmente metiladas. En disolución pueden degradarse mediante procesos de hidrólisis liberando metanol o de despolimerización si la acción hidrolítica o enzimática actúa sobre las uniones α (1 \rightarrow 4) **(Olea et al 1984)**.

Cuando las pectinas son sometidas a condiciones ácidas en el medio de solución, las uniones glicosídicas y los enlaces metil-éster son fácilmente hidrolizados, generando cadenas mas pequeñas o incluso unidades de ácido galacturónico, la reacción que se lleve a cabo depende de la temperatura, a temperaturas bajas el medio ácido tiende a hidrolizar los enlaces del grupo éster con una mínima degradación del polímero, cuya depolimerización se acelera a temperaturas elevadas, tal como se puede observar en la figura 5. Los tratamientos ácidos disminuyen la proporción de azúcares no urónicos, como los arabanos, por su alta sensibilidad al ácido. Tratamientos ácidos muy prolongados o extremos producen la degradación completa con formación de CO₂, furfural y otros productos de degradación **(Fogarty et al 1980)**.

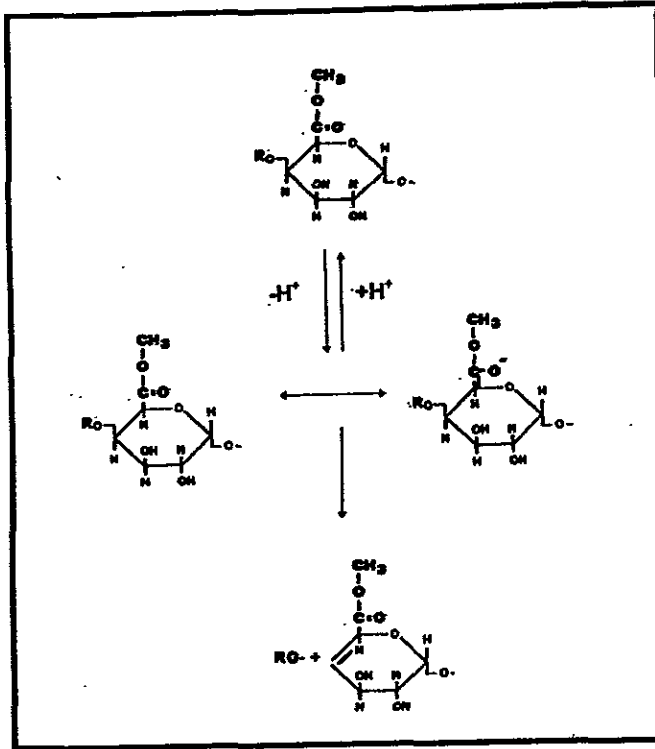


Figura 5. Reacciones de degradación de las pectinas en medios ácidos.

Los tratamientos con álcalis a temperaturas elevadas derivan en una rápida saponificación y ruptura del enlace con el radical, formándose una doble ligadura entre los carbonos 2 y 3 de la molécula de ácido D-galacturónico, e inclusive a temperatura ambiente, soluciones básicas diluidas remueven rápidamente los grupos metil-éster y causa degradación. Se ha sugerido que la pérdida del grupo éster se lleva a cabo mediante una reacción de trans-β-eliminación (figura 6), que ocurre en valores de pH incluso cercanos a 7 con temperaturas elevadas. Esta reacción solamente ocurre en enlaces glicosídicos adyacentes a los grupos carboxilo esterificados, por lo que las pectinas de bajo metoxilo y los pectatos son mucho menos sensibles a los tratamientos con álcali (Nelson et al 1981, Fogarty et al 1980).

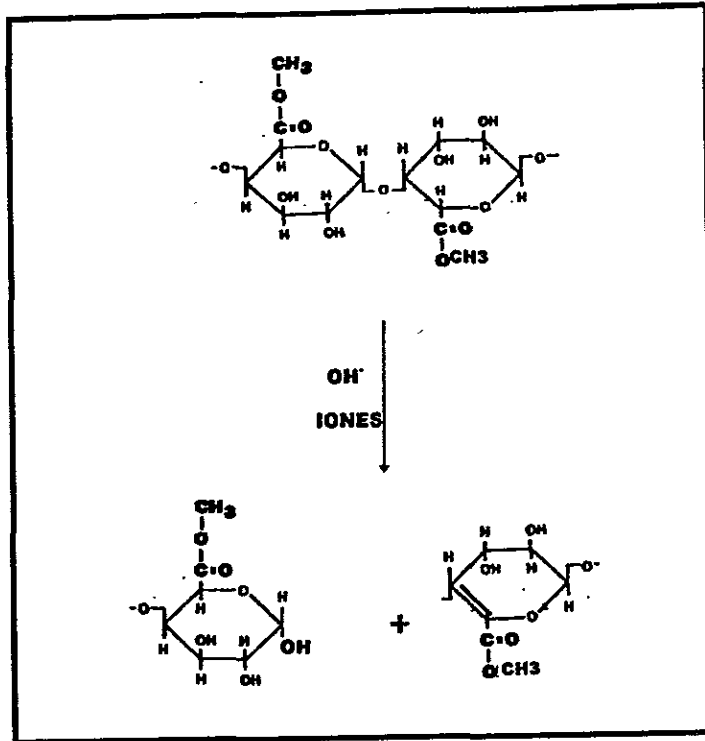


Figura 6.Reacciones de degradación de las pectinas en medio alcalino.

Las sustancias pécticas son degradadas en presencia de agentes oxidantes como peróxido, periodato, permanganato, dicromato, ácido ascórbico y halógenos libres.

Degradación de las pectinas por la acción de enzimas específicas:

Las pectinasas son enzimas con actividad específica sobre las sustancias pécticas, con especial interés de estudio en los procesos de maduración de las frutas, ya que permiten la hidrólisis del material lo que facilita la obtención de material de reserva por parte del embrión en la semilla; algunas pectinasas también son producidas por microorganismos capaces de degradar la pared celular de los vegetales para obtener las unidades monoméricas como fuente de carbono (**Belitz y Grosch 1988**).

Existen diferentes tipos de enzimas con actividad pectinolítica (**Belitz y Grosch 1988, Fogarty et al 1980**):

- **Pectinesterasas**, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y microorganismos, que desmetilan la pectina a ácido péctico. Su inactivación es de importancia en la industria de aditivos alimentarios ya que el ácido péctico forma sales muy insolubles con iones Ca^{2+} , que en los zumos de cítricos ocasionan la formación de precipitados no deseables. Después de la inactivación térmica de la enzima a unos $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ este efecto ya no se presenta, pero se deteriora, sin embargo, el aroma. Las mejoras de este procedimiento provienen de las investigaciones sobre la pectinesterasa de naranja: la enzima es inhibida de forma competitiva por los ácidos oligogalacturónicos y pécticos; así, por adición de tales compuestos pueden ser estabilizadas las turbideces en los zumos de algunas frutas.
- **Hidrolasas y liasas**, son las enzimas que actúan sobre los enlaces glucosídicos del polímero de ácido galacturónico, en el caso específico de las liasas, se cataliza una transeliminación.

Como se puede observar en la tabla de "enzima-sustrato", las enzimas que hidrolizan poligalacturónidos se diferencian además en si atacan pectinas o ácido péctico, y en si la hidrólisis se produce en el interior de la molécula de polisacárido (endoenzima) o éste se va acortando desde un extremo (exoenzima). Las endoenzimas tienen la capacidad de reducir rápidamente la viscosidad de una solución de pectina **(Belitz y Grosch 1988)**.

Las poligalacturonasas se encuentran naturalmente en plantas y microorganismos; todas ellas son activadas en presencia de NaCl y algunas por la presencia de iones calcio **(Belitz y Grosch 1988)**.

Las pectiniasas y pectatoliasas sólo son sintetizadas por microorganismos. En cualquier caso, todas son activadas por la presencia de iones calcio y se diferencian de las poligalacturonasas en su pH óptimo que para las primeras es de 8.5-9.5 y para las segundas de 5 a 6.5 **(Belitz y Grosch 1988)**.

Las enzimas pectinolíticas son utilizadas, entre otras cosas, para la clarificación de jugos de frutas y hortalizas.

Enzima	Sustrato
Poligalacturonasa (PG)	Pectina
Endo polimetilgalacturonasa (Endo PMG)	Pectina
Endo poligalacturonasa (Endo PG)	Acido péctico
Exo poligalacturonasa (Exo PG)	Pectina
Exo polimetilgalacturonasa (Exo PMG)	Acido péctico
Exo poligalacturonasa (Exo PG)	Acido péctico
Pectiniasa (PnL)	Pectina
Endo polimetilgalacturoniasa (Endo PMGL)	Pectina
Pectatoliasa (Ptl)	Acido péctico
Endopoligalacturonatoliasa (Endo PGL)	Acido péctico
Exo poligalacturonatoliasa (Exo PGL)	Acido péctico

En la figura 7 se resume la acción de estas enzimas.

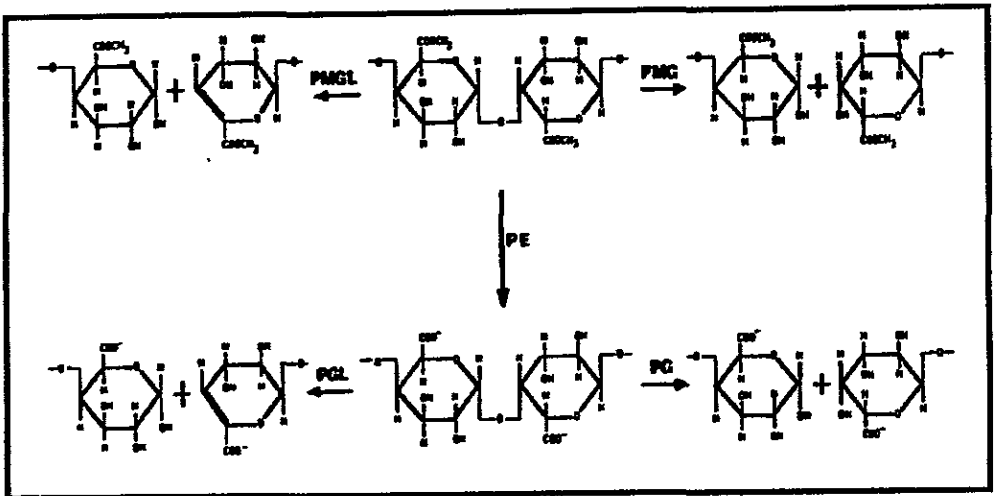


Figura 7. Acción de las enzimas pécticas sobre las uniones de las pectinas.

5.6. La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

5.6.1 Características de la planta.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), es una planta perteneciente a la familia de las malváceas con dos variedades de importancia, la variedad *altissima* que se cultiva para la obtención de fibra y la variedad *sabdariffa* que se cultiva para el uso de sus cálices, es un cultivo anual proveniente de su semilla, originaria de las regiones tropicales de África, que crece favorablemente en climas tropicales y necesita cerca de 25 cm de lluvia cada mes (**Britannica Online. "roselle" 1998**).

Existen diferentes clases de variedades de acuerdo a la finalidad de la explotación, ya que poseen aspectos ligeramente diferentes, algunas variedades se presentan en la siguiente división (**Baley 1949**):

a) variedades productoras de fibra: *altissima* y *bhagalpuriensis*.

- b) variedades intermedias: *intermedius*, *albus* y *ruber*, de éstas variedades se obtienen simultáneamente fibra y cálices.
- c) variedades para obtención de cálices: *archer*, *temprano*, *rico* y *víctor*.

Clasificación botánica de la jamaica.

Familia	<i>Malvaceae</i>
Género	<i>Hibiscus</i>
Especie	<i>sabdariffa</i>
Ploidía	2n=72
Raíz	profunda
Tallo	ramificado
Hojas	inferiores: completas y lanceoladas. superiores: lobuladas.
Flor	completa, solitaria y axilar.
Fruto	cápsula aboide recubierta por el cáliz, contiene numerosas semillas reniformes pubicentis con el hilo rojizo.
Fotoperíodo	es sensible al fotoperíodo corto ya que su floración se presenta cuando los días son más cortos, a partir de noviembre.

5.6.2 Historia de su cultivo.

La planta, conocida en las Indias Orientales a principios del siglo XVI se comenzó a cultivar en la zona asiática en el siglo XVII y con fines comerciales en la década de 1920 en la actual Indonesia, con la finalidad de elaborar costales para la industria azucarera, ya que sus fibras miden hasta 1.5 metros y son además muy resistentes, actualmente la India, la isla de Java y las Filipinas son los principales productores de fibra de jamaica. En varias áreas tropicales los cálices de la flor de la variedad *altissima* son utilizados localmente para la elaboración de bebidas, salsas, jaleas, y chutneys (**Britannica Online. "roselle" 1998**).

5.6.3 El cultivo en México

La jamaica es un cultivo anual de rápido desarrollo, en México se siembra exclusivamente la variedad sabdariffa para la producción de cálices (flor) y fibra, se cultiva principalmente en los estados de Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Colima, y se distingue como principal productor el estado de Guerrero (cerca del 40% de la producción nacional) y en menor proporción el estado de Oaxaca. Los principales municipios productores son Teconapa, Ayutla, Juan R. Escudero, San Marcos, Coyuca de Benítez y Acapulco, los tres primeros representan las zonas más productivas, que se encuentra enclavada en la parte norte de la región conocida como costa chica (Torres 1983 y Vega 1988).

La jamaica es un cultivo temporal, sembrado en mayo o junio y cosechado en diciembre y enero. Casi la totalidad de la flor de jamaica se siembra junto con el maíz, teniendo un rendimiento medio de 108 Kg por Hectárea (Torres 1983).

Los mercados que pueden satisfacer los productos de la jamaica son (Torres 1983):

- a) Mercado de industrializadores (para elaboración de jarabes, extractos, esencias, polvos, etc.)
- b) Mercado de zonas aledañas a los centros de cultivo.
- c) Ciudad de México, que constituye el principal mercado.

5.6.4 Estudios sobre la flor de jamaica y su uso en alimentos.

Los extractos acuosos de cálices de jamaica se han utilizado tradicionalmente en algunas culturas como la Indú, la Egipcia y la propia de México, para elaborar bebidas y salsas, pero algunos estudios recientes han

revelado la posibilidad de utilizar la flor como materia prima para obtener algunos productos de utilidad para la industria alimentaria.

Los pigmentos rojos de la flor de jamaica han sido estudiados con un gran interés, dada la posibilidad de que sustituyan los colorantes artificiales que pueden presentar problemas toxicológicos. Investigadores de diversas partes del mundo han experimentado usando el pigmento extraído de *Hibiscus sabdariffa* como colorante de caramelos y gomas, que además se han estudiado para caracterizar las diferentes moléculas componentes del color, detectándose diferencias según la variedad y las características del proceso de siembra, desarrollo y cosecha (Vega 1988).

Algunos otros estudios se han realizado sobre las semillas de la planta como materia prima para la obtención de aceite, pero se ha detectado la presencia de factores antinutricionales que limitan su aplicación (Torres 1983).

En general, la planta de la jamaica representa una fuente de obtención de diversas materias primas: fibra para elaboración de textiles, moléculas obtenidas a partir de la semilla, y sustancias que pueden extraerse de los cálices, pero no se ha profundizado en tales estudios de las posibilidades de obtención y aplicación de los mismos.

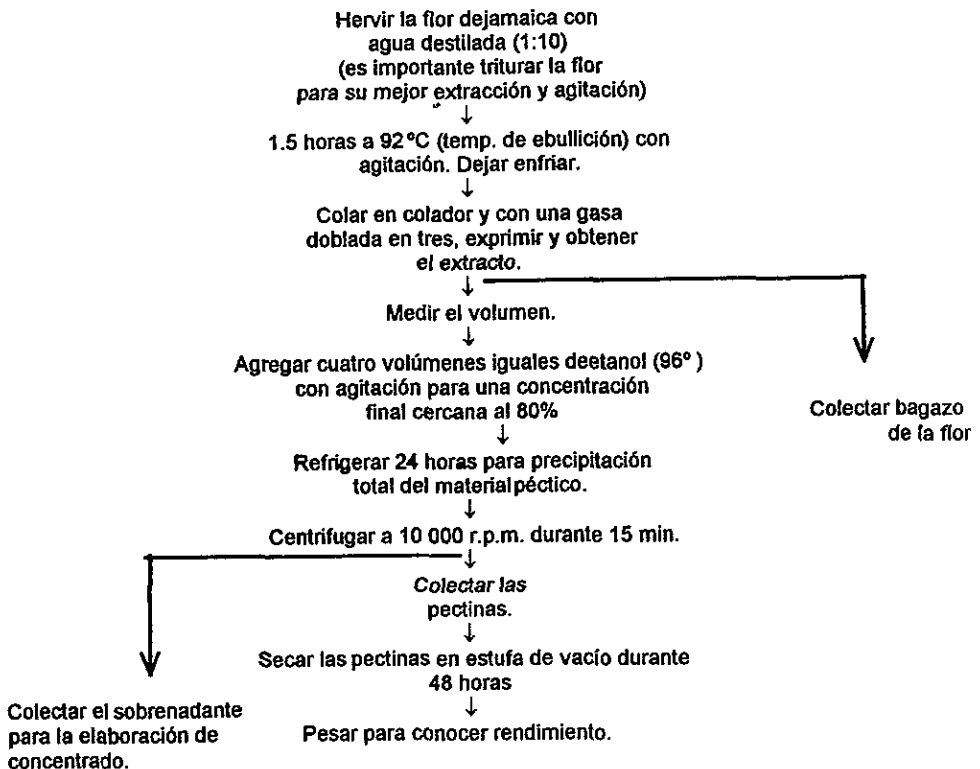
6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.

6.1 Técnica de extracción del material péctico a partir de los concentrados de la flor de jamaica.

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL PÉCTICO.

Las pectinas estudiadas son un subproducto del proceso de elaboración de concentrados del extracto de flor de jamaica, por lo que su técnica de extracción es la que deriva directamente de la obtención del extracto acuoso. A continuación se describe el procedimiento general:

Método de extracción a nivel laboratorio.



Caracterización fisicoquímica de las pectinas de la flor de jamaica.

Como un parámetro de comparación, se decidió realizar los mismos estudios de caracterización que se aplicaron a la pectina de la flor de jamaica, a una pectina cítrica comercial (Pectina cítrica, DROGUERÍA COSMOPOLITA, lote B-1996-0028).

6.2 Determinación del % de pectinas (ac. D-galacturónico) en el material insoluble en etanol.

- Método del oxalato de amonio (Southgate 1992) (ANEXO 1).
- Método de fenol-sulfúrico (Southgate 1992)

6.3 Composición.

Se realizaron también las determinaciones de cenizas y proteínas en la muestra de pectina de flor de jamaica y para la pectina cítrica, además de una cuantificación del porcentaje de azúcares neutros asociados a la cadena.

6.3.1 Determinación de cenizas en el material péctico.

Se utilizó la técnica para determinación de cenizas en material péctico sugerida por Phatak et al 1988 calcinando por 6 horas.

6.3.2 Determinación de proteínas en material péctico.

Se determinó utilizando la unidad de digestión y la unidad de destilación de un equipo KJELTEC SYSTEM 1002. El factor de nitrógeno utilizado fue 6.25.

6.3.3 Determinación de azúcares neutros asociados a la cadena (% de arabinosa).

Se llevó a cabo una determinación de azúcares totales con el método del carbazol (Southgate 1992) (ANEXO 2). Con el resultado obtenido y la cuantificación de ácidos urónicos realizada por el método de fenol-sulfúrico, se calculó la proporción de azúcares asociados por una diferencia de ámbos valores, reportándose como un porcentaje de arabinosa, el azúcar neutro mayoritario en las sustancias pécticas.

6.4 Determinación del grado de acetilacion.

Las técnicas que normalmente se utilizan para determinar el grado de acetilación de una pectina se fundamentan en un proceso de hidrólisis seguido de una cuantificación del ácido acético libre. Para determinar experimentalmente el grado de acetilación de las pectinas de flor de jamaica y la pectina cítrica *comercial* se utilizó un kit comercial para determinación de ácido acético por UV de BOEHRINGER MANNHEIM Cat. No. 148 261 (ANEXO 3) después de haber sometido las muestras al proceso de hidrólisis con hidróxido de sodio 1N por 30 minutos, neutralizándose posteriormente hasta pH=8 (Phatak1988).

6.5 Determinación del grado de metoxilación de las pectinas.

Se evaluaron varias técnicas para determinar el grado de metoxilación de las pectinas se enumeran a continuación.

- Método de Hinton de saponificación modificada (Hinton 1940).
- Hidrólisis seguida de una cuantificación de metanol por el método de la AOAC para bebidas destiladas. (AOAC 958.04 "Methanol in Distilled Liquors").

- La técnica descrita en el inciso anterior, utilizando sales de aluminio para eliminar las pectinas del medio de reacción por precipitación (De Luca 1957).

Finalmente, el grado de metoxilación se determinó mediante un proceso de hidrólisis seguido de una cuantificación de metanol por Cromatografía de Gases en un equipo PERKIN ELMER, SIGMA 2B acoplado a un detector de ionización de flama y a un integrador Hewlett-Packard 3390-A, utilizando nitrógeno como gas acarreador. Se utilizó una columna de acero con Carbowax 1500 al 10% sobre Chromosorb WHP 100/120 de 4ft x 1/8 cm. (Wilson et al 1991, Olea et al 1984). Las condiciones de evaluación se describen a continuación (Walter 1991):

Temperatura del inyector:	220°C
Temperatura de la columna:	125 °C
Temperatura del detector:	250 °C

Con estas condiciones se obtuvo un tiempo de retención de metanol de 0.7 +/- 0.1 min.

6.6 Determinación del peso molecular.

La determinación de peso molecular se llevó a cabo utilizando un equipo de ultrafiltración AMICON sometiendo una disolución acuosa de pectina al 1% al proceso, hasta tener iguales volúmenes del filtrado y de solución sin filtrar, cada una de las soluciones se evaluó por el método de Fenol-Sulfúrico (ANEXO 1) para evidenciar la presencia de la pectina; se utilizaron membranas para moléculas con pesos moleculares mayores a 30,000, 40,000 y 60,000 daltons. Para aproximar los rangos de peso molecular, las pectinas en solución se sometieron a un proceso de diálisis utilizando bolsas para diferente tamaño de partícula: 36,000 a 40,000 daltons y 55,000 a 58,000, utilizando también la técnica de cuantificación de carbohidratos para determinar si el material péctico fue retenido o no.

6.7 Determinación de las características de textura y viscosidad.

Para el análisis de las características del gel que forman las pectinas *caracterizadas se prepararon* soluciones de pectina al 1% bajo condiciones tales que permitiesen interpretar el comportamiento del hirocoloide en un medio con una alta proporción de solidos solubles y en un medio con cationes divalentes, correspondientes a las características de gelificación de las pectinas de alto y bajo grado de metoxilación respectivamente (ANEXO 6).

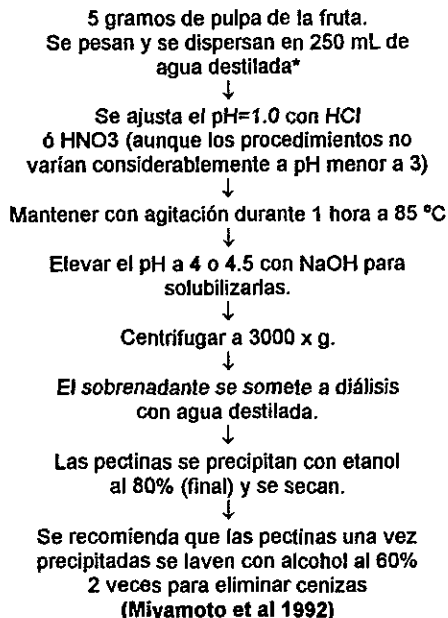
La evaluación de viscosidad se llevó a cabo en un Reómetro marca Fisons modelo HAAKE RV-20, con una geometría de cilindros concéntrico ZB 15, a una temperatura de 25 °C.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Extracción a nivel laboratorio.

La extracción del material péctico a partir de la materia prima puede llevarse a cabo con diferentes disolventes: agua, soluciones de agentes quelantes y medios ácidos o básicos; sin embargo, considerando los fines de este estudio se ha establecido una extracción acuosa ya que, como ya se ha mencionado, las pectinas en estudio y considerando que la materia de estudio de este trabajo son las pectinas de la flor de jamaica, se consideró que en primera instancia era necesario establecer las condiciones de extracción de las pectinas a partir de los concentrados utilizando una extracción acuosa seguida de una precipitación con alcohol etílico. Las técnicas de extracción mas comúnmente utilizadas a nivel laboratorio sugieren el siguiente procedimiento para la obtención de pectinas para análisis posteriores (Miyamoto 1992, Michael 1985).

Método de extracción sugerido en la literatura.



- Pueden extraerse las pectinas con diferentes soluciones: Oxalato, EDTA, etc. **(Phatak et al 1988).**

Pectinas extraídas con etanol a partir de los concentrados.

CONDICIONES	RENDIMIENTO. * (promedio en base seca).
92 °C, 50 % etanol. sin lavados subsecuentes	10.94 %
92 °C, 50 % etanol, con 3 lavados subsecuentes.	6.22 %
92 °C, 80 % etanol, con 3 lavados subsecuentes.	9.652 %
92 °C, 85 % etanol, con 3 lavados subsecuentes.	9.581 %

* valores promedio de cuatro muestras de jamaica sometidas al mismo tratamiento.

En la literatura se reportan concentraciones de etanol de entre 75 % y 85 % para precipitación total del material insoluble en etanol **(Koseki et al 1986, Phatak et al 1988, McCready et al 1966).**

Una concentración final de etanol del 80 % es suficiente para la precipitación de las sustancias pécticas presentes en los concentrados de jamaica ya que la fracción recuperada tanto al 80% como al 85% de etanol es igual; al adicionar alcohol etílico hasta esa concentración garantizamos entonces la precipitación máxima del material péctico.

Como se puede ver, la técnicas de extracción utilizada y las reportadas en la literatura son muy similares entre sí, sin embargo en el caso de las pectinas de jamaica, la acidificación del medio de extracción no es necesaria ya que el extracto de jamaica presenta un pH de 2.5, la temperatura de extracción es menor para la técnica sugerida, y esto puede generar menores rendimientos **(Chang et al 1994)**, pero debemos tomar en cuenta que en este trabajo se esta utilizando un

subproducto de un proceso que se lleva a cabo como ya se ha descrito, por lo que la técnica no puede modificarse.

En este caso la centrifugación de la pulpa no es necesaria ya que la flor se elimina utilizando un colador. Durante el proceso de extracción de las pectinas de jamaica, la obtención se logra con una precipitación y un proceso de centrifugado posterior, por lo que no es necesario dializar.

Sin embargo, para fines de estudio de las pectinas, el precipitado obtenido de la centrifugación se sometió a tres lavados consecutivos con etanol al 80% seguidos en cada ocasión de un centrifugado, para eliminar azúcares, cenizas y otros compuestos asociados a la cadena polimérica.

Una vez extraído el material pectico de la flor de jamaica, el paso siguiente fue realizar un análisis de la composición para conocer las fracciones que conforman al material obtenido y la evaluación de las características de las pectinas, en todos los casos los análisis se llevaron a cabo tanto para la pectina de la flor de jamaica como para una muestra de pectina cítrica comercial utilizada como referencia (Pectina cítrica, DROGUERÍA COSMOPOLITA, lote B-1996-0028).

7.2 Determinación de pectinas (% Ac. D-galacturónico) en el material insoluble en EtOH.

En un principio se llevo a cabo la determinación de ác. D-galacturónico mediante el método del oxalato de amonio (Southgate 1992) (ANEXO 1). Sin embargo esta técnica presentó muchas dificultades experimentales, ya que los embudos de vidrio poroso se tapaban constantemente, por lo que el método fue difícil de llevarse a cabo. Se decidió entonces utilizar un método de cuantificación de azúcares totales de Fenol-Sulfúrico utilizando como solución patrón una muestra de ac D-galacturónico (Southgate 1992).

La proporción de ácido D-galacturónico representa la fracción capaz de formar geles o de actuar como espesante según sus características fisicoquímicas, las pectinas son mas puras mientras su porcentaje de ácido galacturónico es mayor, en este caso, la pectina comercial presentó un valor mayor en cuanto a la proporción de dicha molécula en comparación con la pectina de jamaica estudiada. Normalmente las pectinas comerciales presentan porcentajes de material péctrico alrededor del 75 % (Fishman et al 1984), por lo que la técnica de extracción utilizada permite obtener una pectina con la fracción con propiedades funcionales adecuada para su comercialización. El resto de los componentes en una pectina (representan entre el 15 y el 25%) corresponden a moléculas asociadas a la cadena como azúcares neutros, proteínas y cenizas que le confieren características específicas dependiendo de la proporción en que estén presentes. Para obtener esta información se recurrió a un análisis de la composición.

Los resultados obtenidos por la determinación de % de ác. galacturónico fueron:

muestra	% ác. D galacturónico (base seca).
jamaica	72.18% +/- 2.53%
cítrica	83.41% +/- 1.46%

Lo que indica que las pectinas de la flor de jamaica presentan un valor ligeramente bajo al requerido para ser comercializadas, sin embargo este valor puede aumentarse si se eliminan cenizas y azúcares neutros asociados que son fracciones indeseables en una pectina comercial.

7.3 Análisis de la composición.

• Determinación de cenizas en material péctico.

La determinación de cenizas se utiliza como un parámetro de calidad, es importante determinar las cenizas ya que tienen influencia en el poder gelificante por imposición de fuerza iónica (modifica la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno).

muestra.	% cenizas. (base seca)
jamaica	12% +/- 0.3%
cítricas	0.7% +/- 0.12%

Las pectinas de la flor de jamaica presentan una proporción muy alta e indeseable de cenizas que pueden disminuir e incluso limitar su capacidad de gelificación al imponer una fuerza iónica diferente al medio de disolución.

• Determinación de proteínas en el material péctico.

muestra	% proteína (base seca).
jamaica	4.03% +/- 0.1%
cítrica	9.73% +/- 0.6%

El contenido protéico encontrado para las pectinas cítricas fue mayor que para las pectinas de jamaica, esto se debe a que la fracción protéica no altera la capacidad de gelificar de las pectinas, por lo que comercialmente las técnicas de

purificación se centran mas en la eliminación de cenizas que de proteínas asociadas.

Una alta proporción de cenizas, considerando que las cenizas pueden modificar las características de gelificación de las pectinas, o su poder como agentes estabilizantes, es necesario someter a lavados con etanol acidificado para eliminarlas y obtener pectinas de mayor calidad; con lo que aumentaríamos además la proporción de ac. D-galacturónico.

- **Determinación de azúcares neutros asociados a la cadena (% de arabinosa).**

muestra	% de arabinosa (base seca)
jamaica	6.99 +/- 0.06
cítrica	3.52 +/- 0.07

Frecuentemente se presentan cadenas laterales a la ramnosa de arabanos, galactanos o arabinogalactanos, unidos mediante enlaces α (1-4). Otros azúcares tales como ácido D-glucurónico, L-fucosa, D-glucosa, D-mannosa y D-xilosa pueden encontrarse presentes en dichas cadenas laterales (Walter 1991, Fishman et al 1984, Fogarty et al 1980). Los azúcares neutros asociados a la cadena confieren a la pectina características específicas al disminuir sus posibilidades de gelificación ya que intervienen en la formación de la estructura tridimensional del gel al presentar un impedimento estérico para la interacción de los polímeros. Es recomendable que la proporción de azúcares neutros que se retienen en el material péctico posteriores a la extracción, no sea mayor al 5%, ya que se ha encontrado que concentraciones mayores disminuyen considerablemente las propiedades de gelificación de una pectina. Por lo anterior

se tiene un indicio para sugerir que las pectinas de la flor de jamaica pueden canalizarse a un aprovechamiento como agentes espesantes y no gelificantes.

Determinación del grado de acetilación.

Algunos grupos hidroxilos de carbono 2 y 3 de la molécula del ácido D-galacturónico, pueden estar acetilados, variando proporcionalmente entre 0.1 y 4% de acetilación (Fogarty et al 1980), se ha sugerido que las pectinas comerciales no deben presentar proporciones mayores al 1% de sustitución por ácido acético para no alterar sus propiedades funcionales (Nelson et al 1981). sin embargo, algunos autores reportan valores diferentes. Las pectinas provenientes de ciertas especies, tales como el betabel, presentan proporciones significativas de acetilación sobre los residuos urónicos.

muestra.	% de acetilación. (base seca)
jamaica	4.83 +/- 0.11
cítrica	1.21 +/- 0.08

El grado de acetilación de las pectinas de la flor de jamaica puede generar repercusiones importantes para su capacidad de gelificación, esto aunado a las características de azúcares neutros asociados y al alto porcentaje de cenizas presentes en la muestra, sugiere el aprovechamiento de las pectinas de la flor de jamaica como agentes espesantes y no por su capacidad gelificante.

7.5 Determinación del grado de metoxilación.

Inicialmente se llevo a cabo la determinación mediante el método de saponificación modificado, que tiene como fundamento la hidrólisis de los enlaces éster con una cantidad de NaOH valorada y titulación del exceso, sin embargo los resultados presentaron una dispersión de valores muy alta porque las cantidades de ácido necesario para titular son muy pequeñas.

En el desarrollo de este trabajo, se sugirió una técnica de hidrólisis seguida de una cuantificación de metanol por el método colorimétrico del ácido cromotrópico (AOAC 958.04 "Methanol in Distilled Liquors"). No se han encontrado artículos referentes al empleo de esta técnica para caracterizaron en pectinas. Esta técnica presentó varias problemáticas ya que las pectinas en solución reaccionan con el permanganato de potasio, oxidante fuerte, alterando el resultado colorimétrico de la prueba; por lo que fue necesario plantear una técnica para la eliminación de las pectinas en solución y obtener resultados adecuados, se realizó una precipitación de las pectinas en el medio de reacción con sales de aluminio, recuperándose el material péctico en su totalidad (ANEXO4), pero se detectaron importantes pérdidas de metanol en el proceso de análisis durante el desarrollo de la técnica. Por lo que se decidió cuantificar el metanol liberado por el proceso hidrolítico mediante una técnica de cromatografía de gases.

Al determinarse el grado de metoxilación de las pectinas por una cuantificación de metanol derivado de una hidrólisis por cromatografía de gases se encontraron los siguientes resultados:

muestra	% de metoxilación
jamaica	48.75% +/- 0.31%
cítrica	65.24% +/- 0.86%

Los cromatogramas obtenidos mostraron un tiempo de retención de metanol de 0.7 +/- 0.1 min.

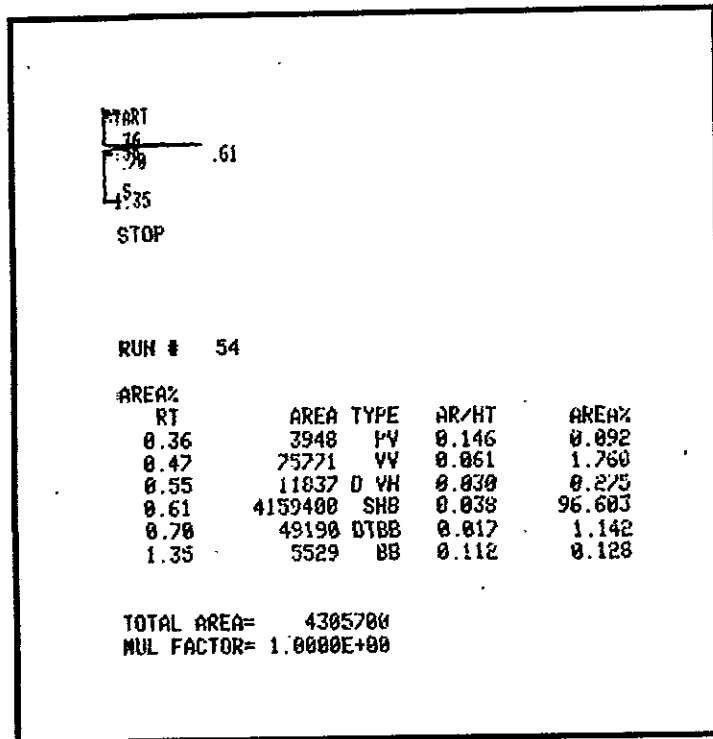


Figura 8. Cromatograma de metanol obtenido a partir de una muestra de pectina cítrica hidrolizada.

Las pectinas se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a su grado de metoxilación, al caracterizar las muestras de pectinas estudiadas, se encontró que la pectina cítrica presenta un grado de metoxilación alto, lo cual concuerda con lo esperado para una pectina comercial cítrica sin haber sufrido modificaciones, para el caso de la pectina de la flor de jamaica se observa que el grado de metoxilación es muy cercano al 50%, lo que le imparte a la cadena características de poca definición frente a los dos grupos mayoritarios de clasificación de las sustancias pécticas por lo que su uso depende de realizar una hidrólisis parcial

sustancias pécticas por lo que su uso depende de realizar una hidrólisis parcial para obtener una pectina con bajo grado de metoxilación. Es importante recalcar que el grado de metoxilación depende en gran medida del estadio de madurez de la flor o fruto en cuestión ya que el proceso de maduración o envejecimiento incluye los procesos de pérdida de rigidez de los tejidos por acción de las *enzimas hidrolíticas* que actúan sobre la pared celular, entre ellas las *pectinesterasas* (sección 5.5.2.5).

7.6 Determinación del peso molecular.

Se establecieron los rangos de peso molecular de acuerdo a la retención de las membranas y/o bolsas de diálisis utilizadas para esta determinación, considerándose como una respuesta positiva una absorbancia mayor a 0.1 en la determinación de azúcares por el método de Fenol-Sulfúrico, correspondiente a 20 µg por mL de ácido D-galacturónico en la curva patrón, se puede observar que las pectinas cítricas presentan un valor de PM similar o cercano al reportado teóricamente (Walter 1991), puede ser menor debido al proceso de estandarización al que el material péctico haya sido sometido (las pectinas a nivel industrial se estandarizan hidrolizando parcialmente las muestras para obtener el mismo grado de metoxilación en toda la fracción péctica de un mismo lote).

muestra	rango de peso molecular
jamaica	36 000 - 40 000 daltons
cítrica	55 000 - 60 000 daltons

Para las pectinas de jamaica el peso molecular del polímero es bajo, como ya se ha revisado, una disminución en el peso molecular del material péctico, disminuye también sus propiedades gelificantes, pero por el contrario, favorece su

7.7 Determinación de las características de gelificación y viscosidad.

La evaluación de geles normalmente se lleva a cabo mediante un perfil de análisis de textura ó TPA (Texture Profile Analysis), que incluye las características de dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad y fracturabilidad, sin embargo, la evaluación del gel no pudo llevarse a cabo ya que los preparados anteriormente descritos no solidificaron aún en refrigeración, por lo que se decidió realizar un análisis de viscosidad de las soluciones de pectina con sacarosa comparadas contra un estándar de sacarosa al 60% bajo las mismas condiciones, para poder establecer una comparación entre las pectinas de jamaica y las pectinas cítricas comerciales.

A partir de la evaluación de viscosidad se obtuvo un gráfico de viscosidad vs fuerza de cizalla (figura 9) que nos permite establecer las características de pseudoplasticidad de cada uno de los fluidos estudiados. Se sometió al análisis un blanco de sacarosa con características de fluido de naturaleza Newtoniana, y se evaluaron las soluciones de pectina cítrica y de pectina de jamaica, en ámbos casos se encontró una modificación en el comportamiento reológico, ya que la presencia de la pectina en solución imparte a la solución de sacarosa características de fluido no Newtoniano. Además, como puede observarse en la curva de viscosidad, la pectina cítrica presentó un índice de viscosidad mayor que la pectina de jamaica, pero con una pseudoplasticidad muy parecida entre ellas. Sin embargo, el aumento de la viscosidad en las soluciones con pectina no fue lo suficientemente grande como para pensarse que puedan aplicarse como agentes espesantes, ya que normalmente los hidrocoloides utilizados con este fin presentan valores de viscosidad del orden de 1 hasta 100 Pa.s y el orden de magnitud para las pectinas estudiadas es menor a 1.

**Curvas de viscosidad
muestras de sacarosa @ 25 °C,
Geometria:
Cilindros concéntricos, ZB 15**

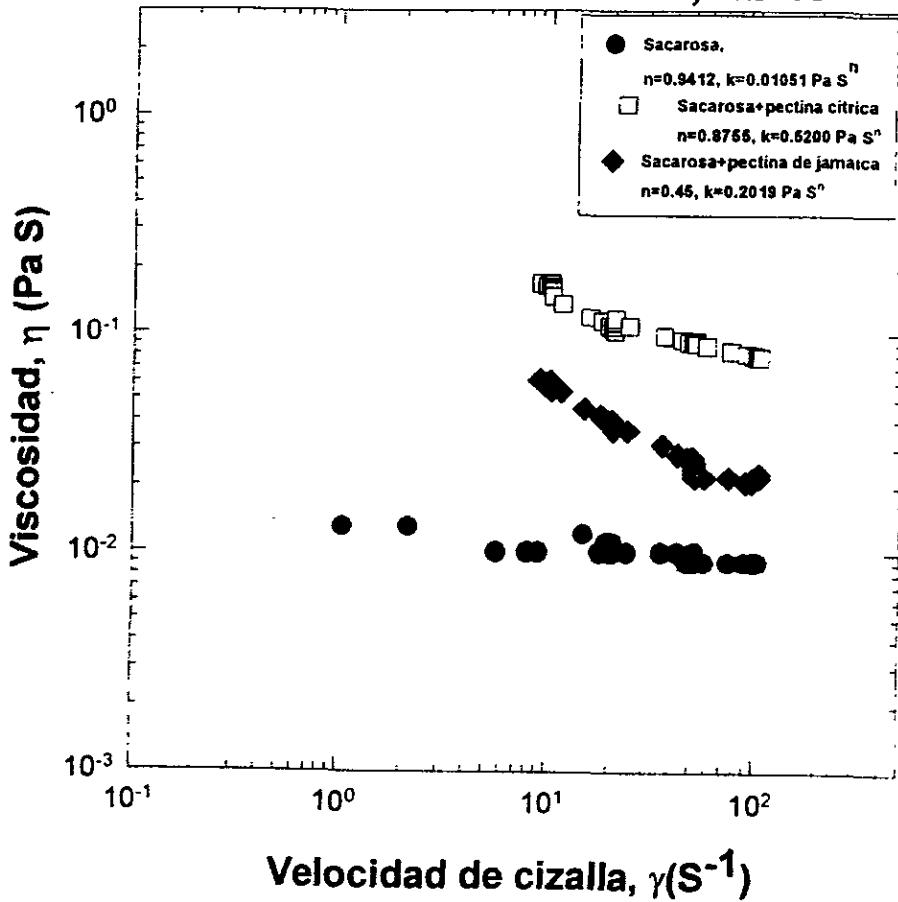


Figura 9. Curvas de viscosidad.

7.8 Tabla comparativa de resultados.

Con el fin de analizar las pectinas de la flor de jamaica estudiadas en el marco de las pectinas comerciales y pectinas ya caracterizadas con un perfil similar al encontrado para el material péctico evaluado, se elaboró una tabla reuniendo la información que permite comparar las características fisicoquímicas y discutir sus aplicaciones en el ámbito alimentario.

tipo de pectina	jamaica, evaluada experimental	cítrica, evaluada experimenta	cítrica, valores comerciales	girasol, valores reportados***	betabel, valores reportados**
% ac. D-galacturónico*	72.18	83.41	>75	71.9	65
% cenizas.*	12.77	0.713	<1	18.5	11.2
% proteína.*	3.99	9.73	<8	6.5	no reportado
% arabinosa*	6.99	3.52	<5	6.46	12.21
% acetilación	4.83	1.21	<1	2.01	16.15
% metoxilación	48.75	65.24	depende****	38.5	65.70
rango de peso molecular (daltons)	36 000 a 40 000	55 000 a 60 000	>60 000	60 000 a 150 000	35 000 a 40 000

*Todos los resultados en base seca.

** Phatak et al 1988, Michael et al 1985.

*** Chang et al 1994, Miyamoto y Chang 1992

**** El grado de metoxilación de las pectinas comerciales puede variar dependiendo de la aplicación a la que sean destinadas.

El perfil fisicoquímico de las pectinas de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) presenta características muy parecidas al material péctico de betabel y de girasol que otros autores han reportado, a diferencia del perfil de las pectinas cítricas evaluadas y para los valores teóricos reportados.

El material péctico de jamaica obtenido presentó una proporción importante de ácido D-galacturónico, por lo que se puede determinar que el proceso de extracción utilizado es bueno, sin embargo es probable que pudieran obtenerse mejores rendimientos si en lugar de realizar una extracción acuosa se llevara a cabo una extracción con una solución salina diluida o un medio con agentes quelantes (sección 5.2.4), pero cabe señalar que las pectinas se estudian como un subproducto derivado del proceso de elaboración de concentrados de la flor, siendo entonces la extracción acuosa la única alternativa viable para la obtención de las mismas.

La caracterización fisicoquímica, como ya se ha mencionado, incluye varias determinaciones, que en conjunto nos permiten predecir el comportamiento de las pectinas (sección 5.6), como ya se discutió, las pectinas de la flor de jamaica no presentan la capacidad de formar geles bajo condiciones estándar de acidez y presencia de sólidos solubles, lo cuál puede atribuirse a varios factores que se discuten a continuación;

La proporción de cenizas es muy alta aún después de someter el precipitado a tres lavados consecutivos, en una segunda etapa de la investigación se decidió dializar la pectina y evaluar el resultado con un análisis proximal, los resultados obtenidos no presentaron una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de cenizas, proteínas y azúcares neutros; además el proyecto "APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA FLOR DE JAMAICA" evalúa la posibilidad de obtener productos de valor agregado pero con técnicas de fácil implementación, por lo que un proceso de diálisis dificultaría poner en marcha la producción de pectinas de jamaica en las comunidades rurales. Una alta proporción de cenizas representa pectinas con una mala calidad para ser utilizadas como agentes gelificantes, ya que los minerales que se disocian en solución imponen una fuerza iónica que impide la formación de puentes de hidrógeno que generan la estructura tridimensional de un gel. Las pectinas

cítricas que tradicionalmente se utilizan como agentes gelificantes en la industria alimentaria y farmacéutica presentan índices de cenizas menores al 1%, por el contrario, las pectinas de betabel y de girasol presentan valores altos, similares a los que se encontraron para el material evaluado (**Miyamoto y Chang 1992**).

El porcentaje de proteínas asociadas a la cadena péctica de jamaica, es bajo, la fracción proteica es un parámetro para evaluar la pureza de las pectinas extraídas, en algunos casos la presencia de proteínas puede modificar la estructura y características del gel formado, sin embargo los valores inferiores al 10% no representan modificaciones funcionales (**Walter 1991**).

Normalmente se presentan varios tipos de azúcares neutros asociados a la cadena de pectina: galactosa, ramnosa, mannosa, xilosa, glucosa, etc., pero la fracción mayoritaria está constituida por arabinosa, por lo que el porcentaje en el análisis se ha representado como % de arabinosa, generalmente las pectinas con un alto contenido de azúcares neutros presentan una capacidad pobre para formar gel, ya que generan un impedimento estérico y la ocupación de los sustituyentes capaces de establecer uniones que forman y estabilizan la red del gel. La pectina evaluada presenta un valor de fracción de azúcares similar al de las pectinas aisladas de girasol, por lo que en ese sentido pueden atribuirse propiedades similares; se ha reportado que las pectinas de girasol (extraídas de la flor) presentan un bajo índice de viscosidad en solución y una mínima capacidad para formar gel, lo cuál se atribuye a la fracción de azúcares presente y al grado de metoxilación de las mismas, ya que su índice de acetilación es bajo y su peso molecular es alto, lo que teóricamente favorece la formación de estructuras tridimensionales. En el caso de las pectinas de betabel, la fracción de azúcares neutros es casi del doble que lo encontrado para las pectinas de flor de jamaica, en este caso el impedimento estérico de los hidrógenos de la cadena impide la formación de un gel, aunado al alto grado de acetilación que presentan,

este factor ha impedido la posibilidad de introducir al mercado las pectinas de betabel como agentes gelificantes.

El porcentaje de grupos acetilo que se encuentran como sustituyentes de los grupos hidroxilo de los carbonos 2 y 3 de la unidad de ácido D-galacturónico modifica radicalmente la posibilidad de una pectina para formar un gel, en el caso de las pectinas de alto metoxilo por el impedimento estérico que representan para los grupos hidroxilo que establecen las fuerzas de unión entre las cadenas de pectina, para el caso de las pectinas de bajo metoxilo, la afinidad de la pectina por los iones calcio disminuye debido al tamaño de los sustituyente que impide la aproximación de las zonas de interacción de las cadenas e impide su acoplamiento en el modelo de cartón de huevo. El alto porcentaje de acetilación de las pectinas del betabel impide la formación de gel en sus estructura, como se puede observar en la tabla de la página 64, las pectinas cítricas evaluadas y las pectinas de girasol tienen un grado de acetilación relativamente bajo, para el caso de la pectina de flor de jamaica, se encontró una fracción de ácido D-galacturónico acetilada que, aunque no es tan alta como para el caso de las pectinas de betabel, sí es capaz de intervenir en la formación de una estructura de gelificación. En la mayoría de los casos de estandarización de pectinas comerciales, cuando una pectina presenta un alto grado de acetilación se somete a un tratamiento de hidrólisis para eliminar los sustituyente acetilo de la cadena, pero solamente puede aplicarse sobre materiales con alto peso molecular ya que las condiciones de hidrólisis modifican también la estructura de la pectina ya que pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4) con lo que el peso molecular disminuye considerablemente, esta técnica no sería entonces recomendable para las pectinas de flor de jamaica que al igual que las pectinas de betabel presentan bajos pesos moleculares.

El porcentaje de metoxilación ha sido uno de los factores principales evaluados para clasificar a las sustancias pécticas, sin embargo, como ya se ha

discutido, no es el único factor que determina las características de gelificación de una pectina. El valor que se ha encontrado para las pectinas de la flor de jamaica es un valor difícil de considerar ya que se encuentra justo en la media entre las pectinas de alto y de bajo metoxilo, como ya ha sido descrito, las pectinas de alto metoxilo gelifican bajo condiciones de pH ácido y una proporción importante de sólidos solubles para disminuir la actividad acuosa del medio y favorecer la formación del gel, y las pectinas con bajo grado de metoxilación gelifican con iones calcio en solución y un en un rango de pH más amplio, sin embargo, al realizar las pruebas de gelificación se observó que bajo ninguno de los dos sistemas las pectinas de la flor de jamaica son capaces de establecer una red tridimensional de gel, lo cual puede deberse a las diferentes características de la pectina ya descritas.

La pectina de la flor de jamaica presenta un peso molecular bajo, tal como en el caso de las pectinas de betabel, lo que les confiere además una disminución en su poder gelificante, a diferencia de las pectinas de girasol que, dado su alto peso molecular son susceptibles de sufrir modificaciones para poder utilizarlas, y convertirlas en pectinas de bajo metoxilo (25-30%) y con ello desarrollar una alternativa viable para su aplicación en la industria alimentaria.

Puede entonces establecerse que las pectinas de la flor de jamaica presentan un perfil fisicoquímico muy parecido al de las pectinas de betabel pero con un grado de acetilación considerablemente menor, lo que permite sugerir que un alternativa que puede evaluarse es hidrolizar la cadena para eliminar los sustituyentes acetilo y disminuir el peso molecular para obtener una pectina de bajo metoxilo, que puede ser ampliamente utilizada en los productos bajos en calorías que requieren un agente gelificante o espesante, por otro lado puede pensarse que dada la similitud en las características de ambas pectinas, los usos que se han estudiado para las pectinas del betabel en la industria alimentaria pueden representar una alternativa de estudio para las pectinas de flor de jamaica

evaluadas en este trabajo, una de las más importantes es su aplicación como agente humectante, lo cual depende directamente de su capacidad para retener líquidos, por lo que se sugiere que se evalúe esta característica de la pectina. Las pectinas han sido evaluadas en investigaciones recientes sobre su capacidad para estabilizar emulsiones y espumas, como el caso de la cerveza y las espumas de pavs, por su capacidad de orientar grupos polares y no polares en una disolución, sobre todo para el caso de las pectinas amidadas; también se ha considerado la posibilidad de utilizarlas como agentes retenedores de algunos compuestos de sabor y aroma, se han utilizado en productos lácteos obteniendo muy buenos resultados para la retención de ácidos grasos en quesos y productos fermentados.

8. CONCLUSIONES.

- Con las condiciones de extracción del material péctico de la flor de jamaica a partir de los concentrados que ya han sido descritas se obtiene un rendimiento cercano al 10% en base seca, por lo que el estudio de sus posibles aplicaciones resulta de interés para el proyecto **APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA FLOR DE JAMAICA**. Es importante recalcar que no se pretende utilizar a la flor de jamaica como una alternativa a las fuentes de obtención de pectinas comerciales, sino que se trata de aprovechar un subproducto de un proceso específico.
- Las pectinas cítricas comerciales presentaron un perfil típico por lo que son un parámetro para la validación de las técnicas de análisis utilizadas.
- Se propuso una técnica alternativa para evaluar el grado de metoxilación de las pectinas basado en la cuantificación de metanol descrita por la AOAC para bebidas alcohólicas destiladas y precipitando las pectinas del medio con una sal de aluminio, sin obtenerse resultados satisfactorios.
- Las características de pureza de las pectinas de la flor de jamaica obtenidas mediante la técnica de extracción sugerida son suficientes como para destinarse al mercado de aditivos, sin embargo sus características fisicoquímicas no son las adecuadas para utilizarse como agentes gelificantes, por lo que es necesario verificar otras alternativas para su aprovechamiento.
- Las características fisicoquímicas de las pectinas de la flor de jamaica pueden variar dependiendo del estadio de madurez de la flor ya que el proceso de maduración o envejecimiento incluye los procesos de pérdida de rigidez de los tejidos por acción de las enzimas hidrolíticas que actúan sobre la pared celular, entre ellas las pectinesterasas.

- Las pectinas de la flor de jamaica presentan un perfil fisicoquímico similar al de las pectinas de betabel, pero con un grado de acetilación mayor, lo que facilita la posibilidad de modificarlas para que puedan ser utilizadas como pectinas de bajo grado de metoxilación en alimentos que así lo requieran.
- El bajo peso molecular y el grado de acetilación de las pectinas de la flor de jamaica son probablemente los factores que limitan su capacidad de formar gel.
- Debe evaluarse la capacidad de las pectinas de la flor de jamaica para estabilizar emulsiones y espumas.
- Dado que las pectinas de bajo metoxilo presentan un efecto sinérgico para formar geles con alginatos en presencia de iones calcio, es posible que las pectinas de flor de jamaica puedan actuar bajo este modelo con un alginato.
- Es posible que las pectinas de la flor de jamaica puedan ser utilizadas como agentes retenedores de sabor y aroma en alimentos.
- Es necesario evaluar la capacidad de retención de agua, y de agentes de sabor y aroma de la pectina de la flor de jamaica, así como su capacidad estabilizante de emulsiones, para poder adecuarla a la industria alimentaria.

9. RECOMENDACIONES.

Con el fin de evaluar la posibilidad de aplicación de las pectinas de la flor de jamaica en alimentos, se sugieren los siguientes temas de análisis dentro de la misma línea de investigación.

- Realizar pruebas de modificación hidrolítica de las pectinas para disminuir el grado de acetilación y el grado de metoxilación con la finalidad de obtener una pectina de bajo metoxilo con características adecuadas de gelificación.
- Evaluar la posibilidad de la pectina de la flor de jamaica para formar gel al combinarse con otro hidrocoloide, generalmente se presenta un efecto sinérgico entre las pectinas y los alginatos.
- Evaluar la capacidad de las pectinas de la flor de jamaica para retener moléculas de sabor y/o aroma en alimentos.
- Realizar pruebas para evaluar la capacidad de las pectinas para actuar como estabilizantes de emulsiones y espumas.
- Realizar un análisis de las pectinas de la flor de jamaica para las diferentes fracciones de extracción.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- AOAC, Official Methods of Analysis (1990) 972.11 "Methanol in Distilled Liquors, Gas Chromatographic Method".
- BALEY, L. Manual of Cultivated Plants. Mac. Millan Co. E.U.A., 1949. 225 p.
- BARFORD, R.A.P. Magidman, S. Phillips y M. Fishman (1986) "Estimation of Degree of Methylation of Pectin by Pyrolysis-Gas Chromatography". *Analytical Chemistry* (58) 2576-2578.
- BELITZ W, y Grosch. (1988) "Química de los Alimentos" 2da ed. Ed. Acribia. España. 813 p.
- BERNARD, M. et al (1981) "Complementary analytical studies on beer foam stabilizers." *Annales des Falsifications et de L'expertise Chimique* (74) 569-574.
- BOEHRINGER, Mannheim. (1995) *Methods of Enzymatic Bioanalysis and Food Analysis*. "Acetic Acid". Cat No. 148 261 Alemania.
- BOURNE, Malcolm (1978) "Texture Profile Analysis" *Food Technology* (7) 62-66.
- BOWERS, Jane. (1992) Food, Theory and Applications. 2nd ed. Maxwell Macmillan Int. Ed. USA. pp 40, 121-122, 695.
- BRITANNICA ONLINE. "roselle" 1998
<<http://www.eb.com:180/cgi-bin/g?DocF=micro/510/47.html>>
- CARBONELL. E, Costell y Duran. (1990). "Determinación del contenido de pectinas en productos vegetales". *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* (30) 1-9.
- CHANG, K.C., N. Dhurandhar, X. You y A. Miyamoto. (1994) "Sunflower Head Residue Pectin Extraction as Affected by Physical Conditions". *Journal of Food Science* (59) pp 1207-1210.

- DE LUCA, G. y M. Joslyn (1957) "The recovery of Pectin From Orange Peel Extracts as Aluminium Pectinate" *Food Technology* 137-141
- ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. (1982) *Micropaedia*, 15va. edicion. Tomo VIII "roselle (*Hibiscus sabdariffa*)" pp 673. USA.
- FENNEMA, Owen. (1991) *Food Chemistry*. 2nd ed. Marcel Dekker. USA pp 123-125.
- FISHMAN, Marshall. Pfeffer, Barford and Doner. (1984) "Studies of Pectin Solution Properties by High-Performance Size Exclusion Chromatography". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (32), 372-378.
- FOGARTY William and Owen P. (1980). "Pectinases and Pectic Polysaccharides" en *Industrial Gums*
- FORD Clive. (1982) "A Routine Method for Identification and Quantitative Determination by Gas-Liquid Chromatography of Galacturonic Acid in Pectic Substances" *Journal of Science Food and Agriculture*. (33) 318-324.
- GUICHARD; E, Issanchou S, Descourvieres A, y Etievant. (1991) "Pectin Concentration, Molecular Weight and Degree of Esterification: Influence on Volatile Composition and Sensory Characteristics of Strawberry Jam". *Journal of Food Science*. (56) 1621-1627.
- HINTON, C.L. (1940) "Fruit Pectins" Chemical Publishing Co. 27-32.
- IFT Comittee, final report. (1959) "Pectin Standarization". *Food Technology*. (13) 496-500.
- KINTER Paul y Jerome Van Buren. (1982) "Carbohydrate Analysis Using the m-Hydroxyphenyl Method" *Journal of Food Science*. (47) 756-759, 764.

- KLAVONS Jerome y Raymond Bennett (1986).** "Determination of Methanol Using Alcohol Oxidase and its Application to Methyl Ester Content of Pectins" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (34) 597-599.
- KOSEKI, M. N. Kitabatake, E. Doi, T. Yasuno, S. Ogino, A. Ito.** (1986) "Determination of Pectin in the Presence of Food Polysaccharides" *Food Technology*.(51) pp. 1329-1332.
- KRATSCHNOV, C. S. Stamov, M, Popova y T. Pantcheva (1982)** "Use of Pectin Emulsifiers in the Production of Food Emulsions with Reduced Energy Content" *Nahrung* (26) 217-227.
- LEXOW, D. G. Dongowski y G. Berth. (1981)** "Osmometric determination of the molecular weight of low esterified pectins in aqueous solutions" *Nahrung*. 19-21.
- LUH, N., J. Flink, M. Karel (1977)** "Fabrication, Characterization and Modification of the Texture of Calcium Alginate Gels" *Journal of Food Science* (42) 976-981.
- MAY, C.D. (1992)** "Pectins" in *Thickening and Gelling Agents for Food*. Edited by Alan Imeson. Blackie Academic & Pro. Gran Bretaña. Capítulo 6. Pp 124-152.
- Mc CREADY (1970).** "Pectin" en *Methods of Food Analysis*. 2da ed. Edited by M.A. Joslyn. Academic Press USA. Capítulo 19. pp 565-599.
- Mc PEAK, D. , E. Idziak y T. Smyrl (1987)** "The effect of Freezing Rate on the Retention of Volatile Fatty Acids During Freeze Drying of Solutions Containing High Molecular Weight Solutes". *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. (20) 176-178.
- MICHAEL, Florence, J. Thibault, C. Mercier, F. Heitz y F Pouillade. (1985)** "A research Note: Extraction and Characterization of Pectins from Sugar Beet Pulp". *Journal of Food Science*. (50) pp. 1499- 1502.

- MIYAMOTO a. y K.C. Chang. (1992). "Extraction and Physicochemical Characterization of Pectin from Sunflower Head Residue". *Journal of Food Science* (57) pp. 1439-1443.
- NELSON, Denny. Smit and Wiles. (1981) "Commercially Important Pectic Substances" in Food Colloids. AVI Pu. Co. USA. pp 418-437.
- NAVARRO, G. Navarro S., Munoz J.J, Lopez J.M.(1983) "Nota. Aplicación de la cromatografía de intercambio iónico al estudio de preparados pecticos comerciales". *Revista Agroquímica de Tecnología Alimentaria*. (53) 143-147.
- OLEA, Serrano, F. Martínez, M. Ruíz y R. García-Villanova. (1984) "Estudio de la degradación de pectinas metiladas en zumos y néctares, determinación del metanol por cromatografía de fase gaseosa" *Anales de Bromatología*. (36) 71-75
- PHATAK, L. Chang y Brown. (1988) "Isolation and Characterisation of Pectin in Sugar Beet Pulp" *Journal of Food Science*. (53) pp 830-833.
- PLÖGER, Annette. (1992) "Conductivity Detection of Pectin: a Rapid HPLC Method to Analyze Degree of Esterification". *Journal of Food Science* (57) 1185-1187.
- PONS, M y S. Fiszman (1996) "Instrumental Texture Profile Analysis With Particular Reference to Gelled Systems" *Journal of Texture Studies*. (27) 597-624.
- RAUCH, George. (1987) Fabricacion de mermelada Ed. Acribia. España. pp 54-57.
- SOUTHGATE (1992). Determination of Food Carbohydrates. Elsevier Scientific Pu. Co 2nd ed. Gran Bretaña. 233 p.

- TORRES Mejía, Alicia Flor. (1983). Tesis "Purificación del Colorante Rojo de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y su aplicación en alimentos". Fac. de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- TOWLE, Gordon and Christensen O. (1973) "Pectin" en Industrial Gums. Whistler Roy ed. Academic Press. USA. pp 429-461.
- VEGA Galeana, Fabiola. (1988) Tesis "Aislamiento e Identificación del Colorante de la Jamaica Mexicana (*Hibiscus sabdariffa*)" Fac. de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- VINCENT, J, G. Jeronimidis, A. Kahn y H. Luyten (1990) "The Wedge Fracture Test, a New Method for Measurement of Food Texture" *Journal of Texture Studies* (22) 45-47.
- VORAGEN, A. Schols J. De Vries, Pilnik y High (1982) "Performance Liquid Chromatographic Analysis of Uronic acids and Oligalacturonic acids". *Journal of Chromatography* (244). 327-336.
- WALTER, Reginald et al (1983). "A Comparison of Methods for Polyuronide Methoxyl Determination" *Journal of Food Science* (48) 1006-1007
- WALTER, Reginald, R. Sherman y C. Lee (1991) The Chemistry and Technology of Pectin Academic Press Inc. USA. 133pp
- WILSON, Linda, J. Ding y E. Woods. (1991) "Gas Chromatographic Determination and Pattern Recognition Analysis of Methanol and Fusel Oil Concentrations in Whiskeys" *Journal of the Association of Analytical Chemistry* (74) 248-256.

ANEXO 1.

Técnicas utilizadas para la cuantificación de % de ácido D-galacturónico.

Método del oxalato de amonio.

(Southgate 1992)

Extracción del material seco con etanol/benceno (1:1)
en Soxhlet para remoción de grasa y pigmentos.



Pesar de 2 a 3 g. del material en un matraz y adicionar 10-15 mL
de solución de oxalato de amonio al 0.5 %. Mantener en
agitación durante 2 horas a 85°C.



Filtrar en embudo de vidrio poroso, recuperar el filtrado.
Se somete el precipitado al proceso de extracción 3 veces más,
recuperando en cada caso el filtrado.



Juntar los 4 filtrados, acidificar hasta pH=4 con
HCl 1N y determinar el volumen total.



Adicionar 4 volúmenes de EtOH con agitación.



Filtrar el precipitado en embudo de vidrio poroso a peso
constante y lavar el precipitado con EtOH 70 % acidificado
(5 % HCl) y posteriormente con acetona.
(eliminación de cenizas y azúcares asociados).



Secar el p.p. en el embudo a 100°C, enfriar en desecador y pesar.



Si el peso del p.p. es menor al 3 % del peso
del material original entonces se consideran
sustancias pécticas, si es mayor, la muestra debe
hidrolizarse en un refujo con H₂SO₄ 0.5 M para
determinación de azúcares por cromatografía.

Método de fenol-sulfúrico

(Southgate 1992).

Diluir los carbohidratos solubles con agua a que se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10-100 microgramos/mL).



En tubos de ensaye perfectamente etiquetados, coloque 1 mL de la solución acuosa de la muestra y adicione 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%.

Mezclando perfectamente después de la adición.



Inmediatamente después de la adición de la solución de fenol, adicionar cuidadosamente 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado mezclando perfectamente.



Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min.) y determinar la intensidad del color naranja obtenido en un espectrofotómetro a 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua como muestra.



Para calcular la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra, prepare una curva patrón de ac D-galacturónico utilizando soluciones que contengan entre 10 y 100 microgramos de ac D-galacturónico/mL de muestra. Tratando cada solución de igual manera que los problemas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO 2.

Técnicas para la determinación de azúcares neutros.

Método del carbazol.

(Southgate 1992)

Se pipetea 5 mL de una solución de tetraborato de sodio 0.025M en ácido sulfúrico concentrado, en un tubo de ensaye y se enfría a 4° C.



Se adiciona 1mL de la solución problema* y se agita suavemente.



Se calienta el tubo en un baño de agua en ebullición, durante 10 minutos y después se deja enfriar a temperatura ambiente. Se adicionan 0.2 mL de una solución de carbazol 0.125% peso en volumen en etanol absoluto.



Se lee la absorbancia a 530 nm.



Proceder de igual manera con la curva patrón y las muestras problema.

*Las muestras deben estar diluidas hasta una concentración entre 4 y 40 µg/mL.

La curva patrón se preparó utilizando ác. galacturónico en una solución saturada de ácido benzóico.

ANEXO 3.

Preparación de muestras y cálculos para la detreminación del % de ácido acético.

La preparación de las muestras se llevó a cabo como se muestra en la siguiente tabla, contemplando la valoración de blancos correspondientes a cada tipo de pectina, blancos con ácido acético adicionado (para verificar la sensibilidad del método), las soluciones problema y un estándar de ácido acético, manteniendo las concentraciones que sugiere el método para mejorar la sensibilidad del mismo. La evaluación en UV se llevó a cabo a $\lambda=365$ nm (Phatak 1988) (BOEHRINGER, técnica de análisis, especificaciones al método).

MUESTRA	PESO DE LA PECTINA	SOLUCIÓN DE ÁCI. ACÉTICO 0.004 μ g ac.acético/mL.	POTASA 1N*	AFORO	CONC. FINAL DE LA PECTINA
Blanco cítrica.	0.5 g	---	---	10 mL	0.05 g/mL
Blanco jamaica.	0.5g	---	---	10 mL	0.05 g/mL
Cítrica hidrolizada	0.5 g	---	3 mL	10 mL	0.05 g/mL.
Jamaica hidrolizada.	0.5 g	---	3 mL	10 mL	0.05 g/mL
Cítrica sin hidrólisis, con ac. acético.	0.5 g	0.1 mL	---	10 mL	0.05 g/mL.
Jamaica sin hidrólisis, con ácido acético.	0.5 g	0.1 mL	---	10 mL	0.05 g/mL.
Estándar de ácido acético.	---	10 mL	---	10 mL	---

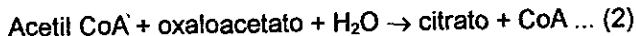
*concentración necesaria para hidrólisis total de grupos acetilo, las muestras se someten al tratamiento durante 30 min. y posteriormente se llevan hasta pH = 8 (Phatak 1988).

Principio de detección (Boehringer 1995):

El ácido acético (acetato) es convertido a acetil CoA en presencia de la enzima acetil CoA sintetasa con adenosin-5'-trifosfato (ATP) y coenzima A.



La acetil CoA reacciona con oxaloacetato dando citrato por la acción de la enzima citrato sintetasa.



El oxaloacetato requerido para la reacción 2 se forma a partir de L-malato y dinucleótido de nicotinamida-adenina, en presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y el NAD se reduce a NADH.



La determinación se basa en la formación de NADH medido por el incremento de absorbancia a 365 nm. Dado el equilibrio de la reacción 3, la cantidad de NADH formado no tiene una proporción lineal con la concentración de ácido acético. De acuerdo a lo indicado en el kit comercial de cuantificación de ácido acético, los cálculos se llevan a cabo como a continuación se indica.

$$\Delta A_{\text{ac. acético}} = \frac{(A_2 - A_0)_{\text{muestra}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{muestra}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{muestra}}}}{(A_2 - A_0)_{\text{blanco}}} - \frac{(A_2 - A_0)_{\text{blanco}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{blanco}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{blanco}}}}{(A_2 - A_0)_{\text{blanco}}}$$

$$\text{Cac acético} = \frac{V \cdot MW \cdot \Delta A}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000}$$

V= volúmen final

v= volúmen de la muestra

MW= peso molecular de la sustancia analizada (ác. Acético)

d= longitud de paso óptico de la celda

ϵ = coeficiente de extinción de NADH $\lambda=365$ nm, $\epsilon= 6.3$ L/mmol cm

ANEXO 4**Recuperación de pectinas con sales de aluminio.**

Normalmente se sugiere que para una solución de pectina que contiene 0.5% en peso del material, se adicionen 12 mL de una solución de cloruro de aluminio preparada con 150 g $AlCl_3$ en 1 L de agua (**De Luca 1957**).

recuperación de pectinas por la técnica de precipitación con sales de aluminio
(cloruro de aluminio $AlCl_3$).

peso pectina inicial	peso pectina final	peso de cenizas (según %)	peso de pectina recuperada
1.0023	1.7084	0.6629	1.0455
1.0265	1.5217	0.5904	0.9313
1.0177	1.7877	0.6936	1.0941

El porcentaje de cenizas encontrado como un promedio de la determinación por triplicado para pectinas precipitadas con cloruro de aluminio fue de 38.8%.

Como podemos ver, utilizando esta técnica se logra recuperar el total de las pectinas, sin embargo, la cantidad de grupos metoxilo encontrados no correspondió al esperado, ya que hubo una pérdida importante de metanol durante el proceso.

ANEXO 5.

Preparación de las muestras para cromatografía de gases.

Técnica de preparación de muestras
para determinación de metanol por
Cromatografía de Gases.

Pesar 0.5g de pectina
↓
Adicionar de 20 a 25 mL de agua caliente
y mantener en agitación hasta disolución.
↓
Adicionar en un sistema de reflujo
(para evitar pérdidas de metanol)*
12 mL de NaOH 0.5 N y
agitar durante 30 min para hidrólisis total.
↓
Llevar a pH=6-7 con HCl.
↓
Aforar a 50 mL con agua.
↓
Mantener a -4 °C hasta determinación
cromatográfica.

*Condiciones de hidrólisis suficientes para hidrólisis total de los sustituyentes
(Towle y Christensen 1973).

ANEXO 6.

Preparación de las soluciones de pectina para evaluación reológica.

Preparación de las soluciones de pectina
para evaluar sus propiedades de gelificación.

Tipo de pectina	% Pectina	% Sacarosa	% CaCl ₂ .2 H ₂ O	Aforo con H ₂ O
Cítrica	1.0	60%	----	100 mL
Jamaica	1.0	60%	----	100 mL
Cítrica	1.0	----	0.2%	100 mL
Jamaica.	1.0	----	0.2%	100 mL

*En las soluciones con sacarosa se estandarizó a un pH de 3.4 y en las soluciones con cloruro de calcio, se estandarizó a un pH de 3.0 con HCl, para lograr una gelificación óptima.