



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**Obtención de pectina mediante Hidrólisis Ácida asistida
con Ultrasonidos de Alta Intensidad a partir de guayaba
(*Psidium guajava L. var. Media China*)**

TESIS

Para obtener el título de
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PRESENTA

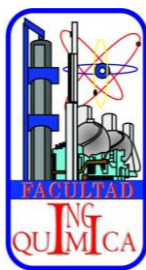
Karla Beatriz Sánchez Valerio

ASESORA

Dra. Edith Corona Jiménez

CO-ASESORA

M.A Tania Meza Gaspar



Puebla, Pue.

Noviembre 2015

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
1. ANTECEDENTES	4
1.1. Descripción de las frutas en la industria alimenticia	4
1.2. Guayaba	4
1.2.1. Composición	5
1.2.2. Producción nacional y mundial de guayaba	6
1.2.3. Uso de la guayaba a nivel industrial	8
1.3. Manejo y producción de desechos	8
1.3.1. Impacto ambiental	9
1.4. Definición de compuestos bioactivos	10
1.5. Pectinas	10
1.6. Clasificación de las pectinas	13
1.6.1. Pectinas de Alto metoxilo	13
1.6.2. Pectinas de Bajo metoxilo	14
1.7. Cuantificación de pectinas por el método colorimétrico m-hidroxibifenil	14
1.7.1. Sólidos Insolubles en Alcohol (SIA) y Pectina Total (PT)	15
1.8. Caracterización de Pectinas	15
1.8.1. Contenido de Metoxilo	15

1.8.2.	Peso Equivalente	16
1.8.3.	Contenido de Ácido Anhidrogalacturónico	17
1.8.4.	Grado de Esterificación	17
1.9.	Identificación de Pectina por Espectrofotometría (FT-IR)	18
1.10.	Técnicas de Extracción	19
1.10.1.	Técnicas de extracción convencionales	19
1.10.2.	Técnicas de extracción no convencionales	20
1.10.3.	Aplicación de los Ultrasonidos de Alta Intensidad para la obtención de Pectinas	24
2.	METODOLOGÍA	25
2.1.	Plan de trabajo	25
2.2.	Diseño de Experimentos	26
2.3.	Etapa 1. Obtención y caracterización de la muestra	26
2.3.1.	Obtención de la muestra	26
2.3.2.	Índice de madurez, pH, acidez titulable y sólidos solubles totales	27
2.3.3.	Acondicionamiento	28
2.4.	Etapa 2. Extracción de Pectinas	29
2.4.1.	Extracción por HA	29
2.4.2.	Extracción por HAUS	29
2.5.	Etapa 3. Cuantificación de pectinas por el método colorimétrico m-hidroxibifenil (SIA y PT)	31
2.6.	Etapa 4. Caracterización de Pectinas	32
2.6.1.	Rendimiento	32
2.6.2.	Peso equivalente	32
2.6.3.	Contenido de Metoxilo (MeO)	33
2.6.4.	Contenido de Ácido Anhidrogalacturónico (AAG)	33
2.6.5.	Grado de Esterificación	34
2.7.	Etapa 5. Identificación de Pectina por Espectrofotometría (FT-IR)	34
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1.	Caracterización de los parámetros ultrasónicos	35

3.2. Cuantificación y Caracterización de pectinas obtenidas a partir de HA e HAUS	36
3.2.1. Características fisicoquímicas de la muestra utilizada	36
3.2.2. Cuantificación de pectinas (SIA y PT)	37
3.2.3. Caracterización de pectinas	39
3.3. Identificación de pectinas por Espectrofotometría (FT-IR)	48
3.3.1. Espectrofotometría IR de pectinas obtenidas a partir de HA e HAUS	48
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Guayaba (<i>Psidium Guajava</i> L. var. <i>Media China</i>)	5
1.2. Producción a nivel nacional de guayaba. Fuente: SIAP, 2015.	7
1.3. Producción a nivel nacional de guayaba. Fuente: COMEGUAYABA, 2015.	7
1.4. Producto elaborado con guayaba (ate)	8
1.5. a) Producto dentro de norma; b) Producto fuera de norma. Ambos procedentes de un mercado local del estado de Puebla.	9
1.6. Pared Celular vegetal.	11
1.7. Región de la cadena lineal de la estructura de la pectina.	11
1.8. Estructura básica de la pectina: a) Representación esquemática convencional, b) Representación actual propuesta.	12
1.9. Estructura primaria del polímero lineal de Homogalacturona unido con 1,4- α -D-ácido galacturónico.	13
1.10. Pectina de Alto metoxilo (PAM) posee un GE>50 %.	14
1.11. Pectina de Bajo metoxilo (PBM) poseen un GE<50 %.	14
1.12. Ácido D-galacturónico con grupos carboxilos libres y grupos ésteres metilados.	16
1.13. Reacción de mecanismo de saponificación del ácido D-Galacturónico (Allinger, 1978).	16
1.14. Reacción de la molécula de ácido D-galacturónico con NaOH.(Allinger, 1978).	17
1.15. Espectro IR de una pectina estándar. Fuente: (Guzmán & Suárez, 1975)	19
1.16. Procesador Ultrasónico.	21
1.17. Clasificación del sonido en función de la frecuencia.	22
1.18. Fenómeno de la cavitación y formación de microburbujas.	23
2.1. Diagrama de Plan de trabajo.	25

2.2. Diagrama de obtención de pectinas mediante HAUS.	30
3.1. Calorimetría empleada para la determinación de potencia real aplicada por el sonicador al medio acidulado (t=3 minutos).	36
3.2. Gráfica a partir de las concentraciones de ácido galacturónico obtenidas.	38
3.3. Rendimiento de pectina obtenido a partir de HA e HAUS.	40
3.4. Pectinas húmedas obtenidas a partir de guayaba mediante HA., B: Pectinas húmedas obtenidas mediante HAUS., C: Pectinas secas obtenidas mediante HA., D: Pectinas secas obtenidas mediante HAUS, a los 10, 30 y 40 minutos de extracción	41
3.5. Porcentaje del grado de esterificación de pectina obtenida a partir de HA e HAUS.	46
3.6. Comparación entre espectros IR de pectinas obtenidas en diferentes tiempos de extracción: a) HA, b) HAUS.	49
3.7. Espectro infrarrojo de pectinas obtenidas a partir de guayaba por HA e HAUS en t=40 min.	51
3.8. Espectro IR de pectina obtenida por HA en un tiempo de extracción de 10 min	56
3.9. Espectro IR de pectina obtenida por HA en un tiempo de extracción de 30 min	57
3.10. Espectro IR de pectina obtenida por HA en un tiempo de extracción de 40 min.	57
3.11. Espectro IR de pectina obtenida por HAUS en un tiempo de extracción de 10 min.	58
3.12. Espectro IR de pectina obtenida por HAUS en un tiempo de extracción de 30 min.	58
3.13. Espectro IR de pectina obtenida por HAUS en un tiempo de extracción de 40 min.	59

ÍNDICE DE TABLAS

1.1. Contenido nutrimental de la guayaba (valor nutrimental por cada 100 g de producto fresco)	6
2.1. Diseño de experimentos.	26
2.2. Especificaciones por normativa de las características de la muestra (guayaba).	27
3.1. Variables para calcular la potencia real entregada por el equipo ultrasónico.	35
3.2. Atributos fisicoquímicos propios de la muestra utilizada	37
3.3. Concentraciones de AGA utilizados para la elaboración de curva de calibración	38
3.4. Pectina total presente en guayaba con diferentes tratamientos	39
3.5. Determinación del peso equivalente (eq/g) de pectina obtenida a partir de guayaba	42
3.6. Determinación del contenido de metoxilo (%) de pectina obtenida a partir de guayaba	44
3.7. Determinación del contenido de AAG (%) de pectina obtenida a partir de guayaba	45

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la extracción asistida con ultrasonidos de pectina de muestras de guayaba, utilizando ácido cítrico como medio de extracción (pH=3). Para ello, una extracción con Hidrólisis Ácida (HA) como procedimiento convencional y una extracción con Hidrólisis Ácida asistida con Ultrasonidos (HAUS) fueron llevadas a cabo. Para los procesos, tres diferentes tiempos de extracción fueron utilizados (10, 30 y 40 minutos) a temperatura constante (75 ± 0.1 °C). Para los ultrasonidos, un máximo del poder eléctrico fue utilizado (100 %). El rendimiento de la extracción (%), el contenido metoxilo (%), el peso equivalente (eq/g), el grado de esterificación (%) y el contenido de ácido anhidro galacturónico (%) fueron evaluados. Finalmente, se llevó a cabo la identificación de la pectina mediante un análisis de espectrofotometría FT-IR. Los resultados mostraron que la extracción asistida con ultrasonidos afectó el rendimiento de extracción de la pectina ($p<0.05$), así, las pectinas extraídas con HAUS mostraron los mayores valores de rendimiento (6.4 %) que aquellas pectinas obtenidas con la HA (2.6 %). Asimismo se pudo observar que existió una diferencia significativa ($p<0.05$) del tiempo de extracción a los 40 minutos en ambos tratamientos, por lo que, un incremento del 42 % entre los 10 y los 40 minutos de extracción para la HA fue obtenida, mientras que para la extracción asistida con ultrasonidos, solo un incremento del 7.8 % del rendimiento de la extracción fue observado. Por otro lado, el incremento del tiempo de extracción afectó significativamente ($p<0.05$) el peso equivalente, por lo tanto, un incremento del 19 % fue obtenido para la HA y un 10.86 % para la HAUS desde los 10 hasta los 40 minutos de extracción, siendo los mayores valores del peso equivalente para la pectina extraída con los ultrasonidos (desde 3194.65 ± 120.10 a 3583.86 ± 256.30 eq/g). El grado de esterificación de la pectina extraída con la técnica ultrasónica fue mayor al 80.58 %, mientras que para extracción convencional con HA un porcentaje del 70.66 % fue alcanzado. A partir de los resultados anteriores, la pectina de guayaba puede ser considerada como una pectina de alto metoxilo debido

a que cuenta con un grado de esterificación mayor al 50 %. No obstante, el contenido de metoxilo es el que determina si la pectina es de alto o bajo metoxilo. Si el contenido metoxilo es mayor que el 7 %, la pectina es considerada como una pectina de alto metoxilo. Por lo tanto, a pesar de que el grado de esterificación fue mayor para ambas pectinas (HA y HAUS), el resultado obtenido en el contenido metoxilo mostró porcentajes más bajos que el 7 %, por lo tanto, la pectina obtenida en el presente trabajo fue considerada como una pectina de bajo metoxilo. Finalmente, la espectrofotometría FT-IR permitió observar las diferencias en el porcentaje de transmitancia de la pectina extraída con tres diferentes tiempos de extracción (10, 30 y 40 minutos), obteniendo los menores valores en pectina extraída con el mayor tiempo de extracción. Asimismo, existió una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de transmitancia entre la pectina extraída por el procedimiento convencional y aquella que fue extraída con los ultrasonidos. Estos hechos podrían estar relacionados con la concentración de pectina, por lo que, para un menor porcentaje de transmitancia, una mayor concentración de pectina. Por lo tanto, la extracción asistida con ultrasonidos puede ser considerada como una herramienta útil para la extracción de pectinas con ácido cítrico a partir de la guayaba.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the ultrasonic assisted extraction of pectin from samples of guava, using citric acid as the extracting agent (pH=3). For that purpose, an Acid Hydrolysis-extraction (AH) as the conventional procedure and the Acid Hydrolysis-extraction assisted with ultrasounds (AHUAE) were performed. The procedures were carried out using three different extraction times (10, 30 and 40 minutes) at constant temperature (75 ± 0.1 °C). For the ultrasonic process, a maximum electric power was used (100 %). The pectin extraction yield (%), methoxyl content (%), equivalent weight (eq/g), degree of esterification (%), and anhydrous galacturonic acid content (%) were evaluated. Finally, it was conducted identifying pectin by FT-IR spectrophotometry. The results showed that the ultrasonic assisted-extraction affected the pectin extraction yield ($p<0.05$), thus, pectins extracted by AHUAE obtained higher values of yield (6.4 %) than those pectins obtained by AH (2.6 %). It was also noted that there was a significant influence ($p<0.05$) of the extraction time at 40 minutes in both treatments, thus, an increase of 42 % between 10 and 40 minutes of extraction for AH was obtained, whereas for ultrasound assisted-extraction, only an increase of 7.8 % of the extraction yield was observed. On the other hand, the increase of the extraction time significantly affect ($p<0.05$) the equivalent weight, therefore, an increase of 19 % was obtained for the AH and 10.86 % for the AHUAE from 10 to 40 minutes of extraction, being the highest values of equivalent weight for pectin extracted with ultrasounds (from 3194.65 ± 120.10 to 3583.86 ± 256.30 eq/g). The degree of esterification of pectin extracted using the ultrasonic technique was above 80.58 %, while for the conventional extraction with AH a percentage of 70.66 % was reached. From the above results, pectin from guava can be categorized as high methoxyl pectin because it has a degree of esterification that is higher than 50 %. Notwithstanding, the methoxyl content is what determines if pectin is high or low methoxyl pectin. If the methoxyl content is higher than 7 %, the pectin is considered as high methoxyl pectin. Therefore, in spite that the degree

of esterification was higher for both (AH and AHUAE), the results obtained in the methoxyl content showed lower percentages than 7 %, thus, the pectin obtained in the present work was considered as a low methoxyl pectin. Finally, the FT-IR spectrophotometry allowed to observe differences on the percent of transmittance for the pectin extracted with the three different extraction times (10, 30 and 40 minutes), obtaining the lowest values in pectin extracted with the longer extraction time. As well as, there was a significant ($p < 0.05$) difference of the percentage of transmittance between pectin extracted by conventional procedure and this which was extracted with ultrasounds. These facts could be related with the concentration of pectin, thus, for the lower percent of transmittance, the higher the pectin concentration. Therefore, the ultrasonic assisted-extraction could be considered a reliable tool for the extraction of pectins with citric acid from guava.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la industria alimentaria se conoce como uno de los sectores productivos que mayor impacto tiene sobre el medio ambiente, esto se debe a que durante las etapas de transformación de materia prima a producto terminado se generan grandes cantidades de residuos orgánicos, los cuales en base a sus características se clasifican para la aplicación o el fin que se les puede dar a los mismos. Por lo tanto, dichos residuos, resultan ser una fuente rentable para la obtención de compuestos de interés (pectinas) (Morales, 2015; Viniegra & Jáuregui, 2001).

Las pectinas son compuestos de alto peso molecular, hidrosolubles de origen vegetal presentes en la pared celular con predominancia en la lámina media de fuentes naturales como son las frutas y verduras (Maldonado-Culquimboz *et al.*, 2010). Asimismo, se consideran un polisacárido complejo insoluble en alcohol y disolventes orgánicos, constituido por ácido D-galacturónico unido por enlaces α -1,4 el cual se encuentra parcialmente esterificado por grupos metilo. Dichos compuestos, resultan de gran interés ya que por un lado, son considerados como ingredientes funcionales, es decir, que al ser consumidos de forma directa o indirecta, tienen la capacidad de disminuir y prevenir enfermedades entre las cuales destacan las cardiovasculares (colesterol en la sangre), metabólicas y digestivas (diabétes, obesidad, colitis y cáncer colorrectal) (Pak, 2000; Wang *et al.*, 2014). Por otra parte, resultan altamente demandados por parte de la industria alimentaria como espesante y gelificante ya que, posee la capacidad de formar geles en un medio ácido (Cristina, 2012). La obtención de pectinas a nivel industrial principalmente se da a partir de fuentes ricas en estos compuestos, siendo las principales el bagazo de manzana y cáscaras de cítricos. En el caso de las manzanas, el contenido péctico se encuentra entre el 15 y el 18% a comparación de los que se obtienen a partir de cítricos que cuentan con un porcentaje del 25% (Chacín & Marín, 2010). Se sabe que a nivel industrial las pectinas se extraen a altas temperaturas para hidrolizar la protopectina usando ácidos como el sulfúrico, fosfórico, nítrico, clorhídrico o cítrico. Después de

la concentración, la pectina se precipita con la adición de alcohol, se seca, se granula y finalmente se tamiza (Woo *et al.*, 2010).

A comparación de las tecnologías tradicionales existen técnicas nuevas las cuales permiten asistir el proceso de extracción, es este el caso de los Ultrasonidos de Alta Intensidad (USAI) ya que se les considera una técnica nueva la cual permite que los compuestos a buscar se desprendan de una forma adecuada de la pared celular sin que pierdan sus propiedades esenciales (Abid *et al.*, 2014). Se entiende por ultrasonidos a las frecuencias de sonido que oscilan desde los 20 kHz hasta los 100 kHz, y es por ello que se produce un efecto llamado *cavitación*, el cual se define como la producción de burbujas que colapsan alrededor de la pared celular ocasionando una ruptura (Awad *et al.*, 2012; Golmohamadi *et al.*, 2013) la cual permite que los compuestos bioactivos, como las pectinas, se liberen y el solvente que se utiliza durante este proceso penetre dicha pared mejorando la transferencia de masa, eso ocurre gracias al hinchamiento e hidratación que sufre la pared celular cuando se somete al tratamiento por ultrasonidos. De esta manera, se puede asistir el proceso de extracción de compuestos funcionales ya que se reduce el uso de solventes y energía, así como el tiempo de extracción (Chemat & Khan, 2011; Da Porto *et al.*, 2013; Pingret *et al.*, 2013; Roseiro *et al.*, 2013), de igual forma la combinación de ambos tratamientos genera un aumento en el rendimiento de compuestos obtenidos los cuales son similares al uso de ácidos altamente contaminantes como lo es el ácido nítrico ya que este ácido permite el mejor medio de extracción (Minjares-Fuentes *et al.*, 2014). No obstante, existen factores como lo son las condiciones del proceso y la naturaleza del alimento los cuales influyen en la pérdida de compuestos de interés en los alimentos, estos se relacionan a las reacciones químicas que se producen en el alimento, consecuencia de las condiciones de proceso a los que se someten los alimentos así como la naturaleza del mismo (Dubie *et al.*, 2013). Por lo tanto, se deben explorar los procesos de extracción para así demostrar el potencial que esta técnica actual promete partir de esto surgen investigaciones (Chandrapala *et al.*, 2013; Rostagno *et al.*, 2003) las cuales afirman que la sonicación permite optimizar la obtención de compuestos bioactivos (pectinas) cuando se utiliza como una técnica asistida a un tratamiento convencional como lo es la Hidrólisis Ácida y asimismo se considera una técnica nueva y prometedora que posee los requerimientos más bajos a comparación de las tecnologías desarrolladas en los últimos años.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener pectinas mediante Hidrólisis Ácida asistida con Ultrasonidos de Alta Intensidad a partir de guayaba (*Psidium guajava* L. var. *Media China*).

Objetivos Específicos

- Cuantificar la cantidad de Pectina Total (PT) a partir de Sólidos Insolubles en Alcohol (AIS).
- Aplicar los métodos de Hidrólisis Ácida con y sin la aplicación de Ultrasonidos de Alta Intensidad para la extracción de pectina a partir de muestras de guayaba.
- Caracterizar la pectina obtenida con Hidrólisis Ácida e Hidrólisis Ácida asistida con Ultrasonidos de Alta Intensidad.
- Identificar mediante Espectrofotometría FT-IR los grupos funcionales presentes en las pectinas obtenidas con Hidrólisis Ácida e Hidrólisis Ácida asistida con Ultrasonidos de Alta Intensidad.

1. ANTECEDENTES

1.1. Descripción de las frutas en la industria alimenticia

Se considera que las frutas resultan importantes para la alimentación humana. La mayor parte de los procesos que se realizan en los frutos son en condiciones frescas, en los últimos años ha resultado de gran interés su uso a nivel industrial como alimentos procesados (conservas, mermeladas, entre otros) (Gutiérrez *et al.*, 2009). Los métodos de transformación de frutas generan una amplia cantidad de subproductos, residuos y productos fuera de norma, por lo que en los últimos años se ha buscado además de su aprovechamiento, su disminución. Siendo esto, una solución que contribuye al desarrollo industrial sostenible de nuevos productos. Este tipo de residuos pueden ser utilizados en alimentación animal y humana, abonos, obtención de biogás, en la extracción de aceites esenciales, pectinas, flavonoides, entre otros (Yepes *et al.*, 2008).

1.2. Guayaba

El fruto conocido como guayaba (*Psidium guajava* L. var. *Media China*) es un fruto tropical perteneciente a la familia Myrtaceae (Marquina *et al.*, 2008), con forma ovoide y su tamaño comúnmente es de mediana a grande (<80 g), posee una epidermis de color amarillo brillante en frutos maduros, con pulpa de color crema a amarilla de aroma agradable y alto contenido de semillas (González-Sánchez *et al.*, 2000). Su sabor depende del estado de madurez en el que ésta se encuentre, cuando ésta se encuentra en su totalidad madura presenta un sabor dulce y de lo contrario si esta presenta una madurez temprana posee un sabor ácido. La madurez se observa en la cáscara cuando alcanza un color verde amarillento o amarillo rosado (Figura

1.1). Este fruto además de poseer olor y sabor característico, también es una fuente rica en pectinas de alto metoxilo así como de Ácido Galacturónico (AGA) (Chacín & Marín, 2010).



Figura 1.1. Guayaba (*Psidium Guajava* L. var. *Media China*)

1.2.1. Composición

La guayaba, posee altas cantidades de agua así como vitaminas en especial es un fruto rico en Vitamina C. En la Tabla 1.1 se presentan los componentes presentes en la guayaba como lo son agua, proteínas, grasas, carbohidratos, fibra, calcio, fósforo, hierro, magnesio, zinc, sodio, potasio, riboflavina, tiamina, Vitamina B6 y ácido ascórbico, así como sus cantidades correspondientes.

Tabla 1.1. Contenido nutrimental de la guayaba (valor nutrimental por cada 100 g de producto fresco)

Componente		Cantidad
	Agua	80.80 g
	Proteínas	2.55 g
	Lípidos	0.95 g
	Carbohidratos	14.32 g
	Fibra dietética	5.4 g
	Azúcares	8.92 g
Minerales	Calcio	18 mg
	Fósforo	40 mg
	Hierro	0.26 mg
	Sodio	2 mg
	Potasio	417 mg
	Magnesio	22 mg
	Zinc	0.23 mg
Vitaminas	Vitamina C	228.3 mg
	Vitamina B6	0.110 mg
	Tiamina	0.067 mg
	Riboflavina	0.040 mg
	Vitamina E	0.73 mg

Fuente: (USDA, 1987).

1.2.2. Producción nacional y mundial de guayaba

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SAGARPA, 2015) reporta una producción a nivel nacional de 207,866 toneladas métricas las cuales se concentran en dos diferentes condiciones agroclimáticas, las cuales se localizan en el centro del país, la primera es la región de Calvillo, Aguascalientes y la segunda se encuentra en el oriente del estado de Michoacán, conformado por los municipios de Jungapeo, Juárez, Zitácuaro, Susupuato, Tuxpan y Tuzantla, en los cuales se cultiva un 55,03 % de la superficie del presente fruto. Asimismo, la SIAP registra datos en 19 Estados del país con un total de 20,899 Ha sembradas y 14,422 Ha cosechadas. En 2015, Michoacán reporta un total de 9,449 Ha sembradas y 7,796 Ha cosechadas; siendo el primer productor a nivel nacional con un 55,03 % de la superficie total sembrada. En tercer lugar aparece Aguascalientes con un total de 6,268

Ha sembradas de las cuales se cosecharon 2,426 Ha, que representan el 18.33 % de la producción nacional, tal y como se muestra en la Figura 1.2.

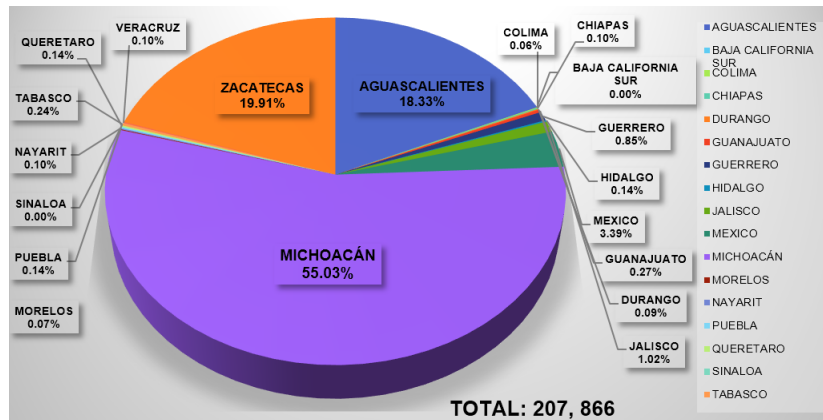


Figura 1.2. Producción a nivel nacional de guayaba. Fuente: SIAP, 2015.

La producción a nivel mundial de guayaba se estima en 500,000 toneladas métricas. Actualmente, la fruta se encuentra diseminada en áreas de climas tropicales y subtropicales, cultivándose en forma comercial en la India, Pakistán, Hawai, Florida, Puerto Rico, Cuba y en algunos países de Sudamérica como Brasil, Colombia, México y Venezuela. Las variedades que se comercializan en Europa proceden principalmente de Sudáfrica y Brasil. México, según el Consejo Mexicano de la Guayaba (COMEGUAYABA) participan en la producción mundial con el 25.0%. El principal productor es Pakistán, con el 50.0% de la producción en el mercado mundial como se presenta en la Figura 1.3.

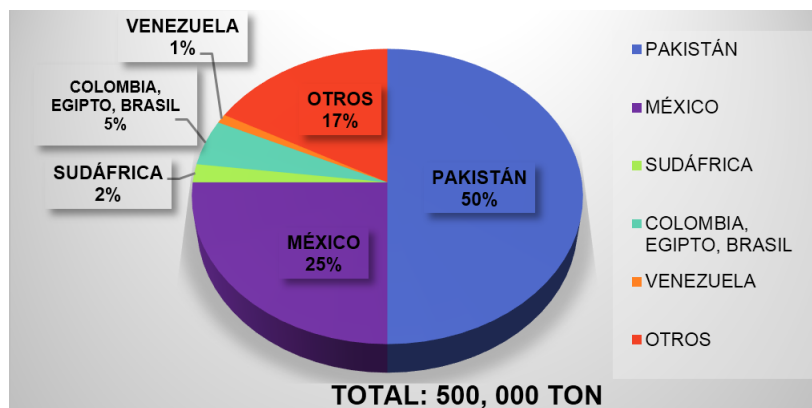


Figura 1.3. Producción a nivel nacional de guayaba. Fuente: COMEGUAYABA, 2015.

1.2.3. Uso de la guayaba a nivel industrial

El consumo de este fruto es principalmente en forma fresca (87 al 92 %) y el resto es usado a nivel industrial para procesar bebidas, mermeladas y otros productos afines (Figura 1.4) (González-Sánchez *et al.*, 2002). Según la (Faostat, 2009), durante el procesamiento de mermelada de guayaba, la fruta de rechazo o fuera de norma surge en la etapa de selección de materia prima y esta es desechada desperdiciando grandes cantidades de materia prima.



Figura 1.4. Producto elaborado con guayaba (ate)

1.3. Manejo y producción de desechos

En el proceso productivo de los alimentos, además del producto deseado, se generan subproductos, residuos y productos fuera de norma (Méndez, 1995), cada uno de los cuales pueden servir para consumo humano o animal y aplicación industrial, lo que traería beneficios tanto económicos como ambientales. Sin embargo, la mayoría de este tipo de industrias no tiene algún plan para estos residuos, debido al alto costo de su reutilización y por el contrario, los ubican junto con la basura en los vertederos o rellenos sanitarios.

Se han buscado alternativas que permitan la reutilización de residuos, y una de ellas es la obtención de subproductos que otorguen un valor agregado al procesamiento de frutas y hortalizas tales como las pectinas, fibra comestible, ácido cítrico, almidones, entre otros, trayendo como resultado ser incorporadas a otros procesos agroalimentarios. La recuperación de estos residuos es considerada una opción viable para la obtención de diversos subproductos ya que las cantidades de residuos que se generan son altas durante los diversos procesos industriales (Saval, 2012; Sánchez *et al.*, 2009).

1.3.0.1. Productos fuera de norma

Se conoce que los productos fuera de norma, son aquellos que no cumplen con las características correspondientes a la normativa la cual puede preceder a nivel nacional o internacional. Por una parte la normativa mexicana que hace referencia a las características del fruto conocido como guayaba en forma fresca, en donde se indican las propiedades fisicoquímicas del mismo es la NMX-FF-040-1993. Por otro lado, a nivel internacional la normativa que rige las condiciones así como las variedades que habrán de suministrarse frescas al consumidor, después de su acondicionamiento y envasado, es el CODEX STAN 215-1999 (Figura 1.5).



Figura 1.5. a) Producto dentro de norma; b) Producto fuera de norma. Ambos procedentes de un mercado local del estado de Puebla.

1.3.1. Impacto ambiental

La industria alimentaria es uno de los sectores productivos que mayor impacto tiene sobre el medio ambiente, bien sea por sus procesos productivos o por los diferentes productos que salen al mercado. Cada sector en particular genera residuos en diferentes porcentajes de acuerdo con los tipos de productos que fabrican. El procesamiento de las frutas y vegetales compromete en gran medida las aguas residuales y los residuos sólidos. Las primeras son altas en sólidos suspendidos, azúcares, harinas, agentes de blanqueado, sales e, incluso, residuos de pesticidas. Los segundos comprenden desechos de los procesos mecánicos de separación y preparación como semillas, hojas, tallos y cáscaras, además de las unidades descartadas (por defectos físicos o biológicos) y en general no se emplean como alimento para animales. En lugar de ello se manejan procesos tradicionales de disposición en

rellenos sanitarios o programas de compostaje (Restrepo-Gallego, 2012).

1.4. Definición de compuestos bioactivos

Se conoce como compuestos bioactivos (CBA) a aquellos capaces de aportar un beneficio a la salud más allá de los beneficios nutricionales que aportan normalmente, entre estos compuestos podemos encontrar a las pectinas, aceites esenciales, vitaminas, minerales, antioxidantes y almidones resistentes (Lattimer & Haub, 2010; Li *et al.*, 2009). De igual forma se consideran metabolitos con efectos nutracéuticos comúnmente de origen vegetal, que modulan las funciones terapéuticas en el cuerpo las cuales resultan benéficas para la salud así como ayudan a reducir enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades coronarias, Alzheimer, entre otras (Biesalski *et al.*, 2009; Denny & Buttriss, 2007; Roberfroid, 1999). Es bien conocido que la biodisponibilidad de los CBA es diferente cuando se ingieren puros y cuando se consumen dentro de su matriz original, en este caso se debe tomar en cuenta que se pueden encontrar una diversidad de CBA en la fuente alimenticia donde se derivan y estos pueden interactuar conjuntamente o ejercer un efecto sinérgico (Gil-Hernández & López-Ruiz, 2009).

1.5. Pectinas

Las pectinas son polisacáridos de origen vegetal, solubles en ácidos y agua, con una alta demanda a nivel industrial hortofrutícola por poseer propiedades de gelificación, estabilización de emulsiones y aporte de fibra nutricional. Se encuentran en la pared celular primaria en las regiones intracelulares de frutas y hortalizas (Aldana-Villaruel *et al.*, 2011). En la Figura 1.6 se observa la estructura de la pared celular especificando la presencia de pectina en ella.

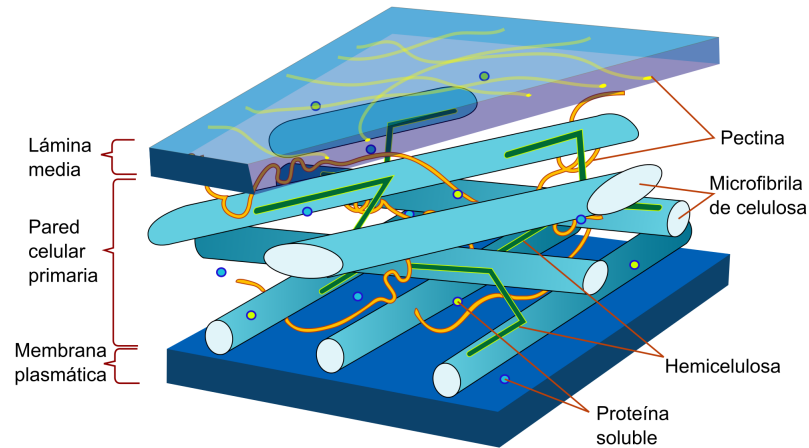


Figura 1.6. Pared Celular vegetal.

Estructuralmente, las pectinas se encuentran constituidas por cadenas de AGA (Figura 1.7) unidos entre sí por enlaces α -1,4 (Fishman & Cooke, 2009).

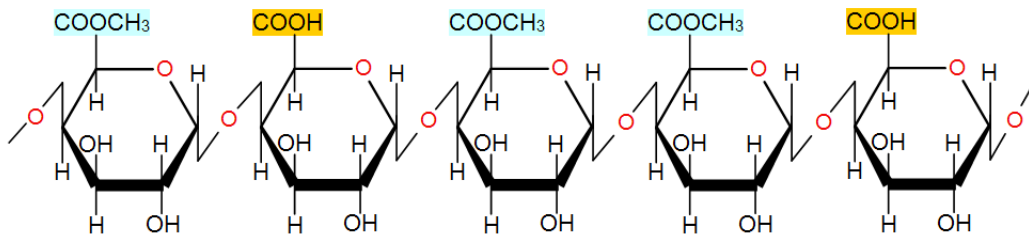


Figura 1.7. Región de la cadena lineal de la estructura de la pectina.

Se sabe que algunos de los grupos carboxílicos presentes en las moléculas de AGA en las cadenas de pectina están metil esterificados y el porcentaje de éstos se expresa como grado de esterificación GE. La Homogalacturona (HG), Rhamnogalacturona-I (RG-I) y galacturonas sustituidas son polisacáridos procedentes de la pectina, han sido separados y caracterizados ya que contienen AGA en mayor o menor cantidad. Actualmente se sabe que el primer y segundo polisacárido mencionado son los constituyentes de mayor importancia de los polímeros pécticos, como se muestra en la Figura 1.8 a. Asimismo, existen estructuras propuestas recientemente donde afirman que el polisacárido Homogalacturona es una cadena de Rhamnogalacturona-I, esto puede observarse en la Figura 1.8 b (Silva *et al.*, 2008).

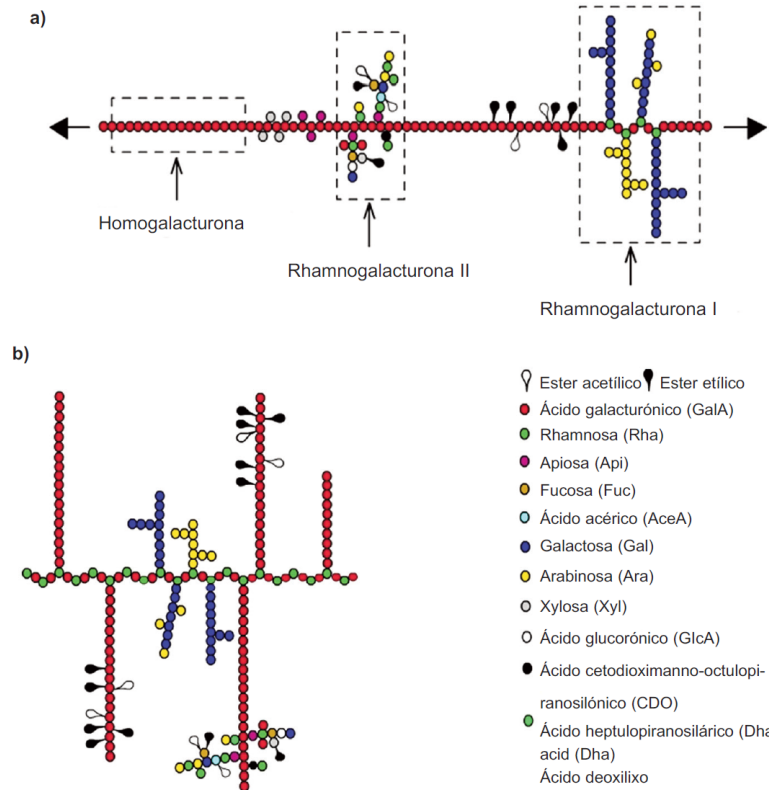


Figura 1.8. Estructura básica de la pectina: a) Representación esquemática convencional, b) Representación actual propuesta.

La HG (Figura 1.9) es una cadena lineal de 1,4- α -D-ácido galacturónico, en el cual algunos de los grupos funcionales (carboxilos) se encuentran metilesterificados. Por un lado, RG-I es un grupo de polisacáridos pécticos que contienen disacáridos la cual representa del 20 al 35 % de la pectina, se caracteriza por poseer una variedad de diferentes cadenas de glucanos (principalmente arabinana y galactana) ligadas a las unidades de ramnosa (Rodríguez *et al.*, 2006). Por otro lado, se encuentra la Rhamnogalacturona-II (RG-II) es un polisacárido que compone el 10 % de la pectina, ya que contiene en su estructura lineal residuos de AGA. Este polisacárido se encuentra presente en las paredes celulares de las plantas (Chasquibol, 2010).

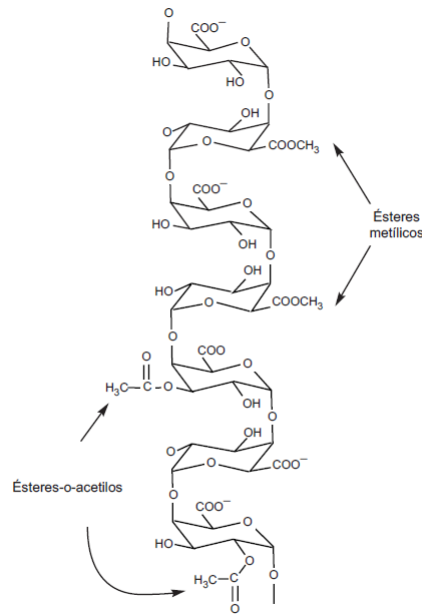


Figura 1.9. Estructura primaria del polímero lineal de Homogalacturona unido con 1,4- α -D-ácido galacturónico.

1.6. Clasificación de las pectinas

Las pectinas se clasifican en dos grupos a partir del grado de esterificación que presenten, el primero se le conoce como pectinas de alto metoxilo (PAM) con un GE mayor a 50 % y pectinas de bajo metoxilo (PBM) con un GE menor a 50 % (Mollea *et al.*, 2008).

1.6.1. Pectinas de Alto metoxilo

Para la formación de geles a partir de pectinas con un alto contenido de metoxilo (PAM), es necesaria la incorporación de grandes cantidades de sólidos solubles (azúcar) entre el 60 y 70 % así como el uso de pH's bajos (entre 2.8 a 3.5). Este tipo de pectinas tienen un GE mayor al 50 % como se mencionó anteriormente, es decir, 50 % de los grupos carboxilos presentes en la estructura de la pectina se encuentra esterificado con metanol como se puede ver en la Figura 1.10. El GE de las pectinas de alto metoxilo influye mucho sobre sus propiedades, por lo que a mayor grado de esterificación, mayor es la temperatura que necesita para gelificar.

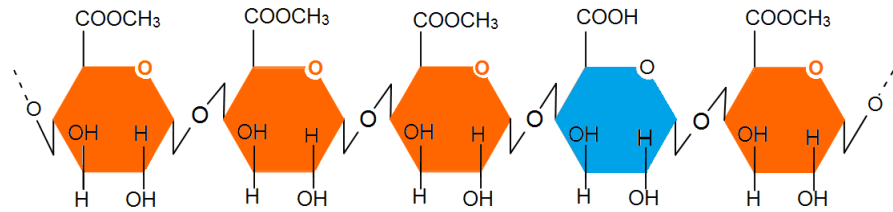


Figura 1.10. Pectina de Alto metoxilo (PAM) posee un GE>50 %.

1.6.2. Pectinas de Bajo metoxilo

Las pectinas de bajo metoxilo (PBM) requieren de iones calcio para formar geles. Estas pectinas forman geles con ayuda de enlaces iónicos entre el calcio (Ca^{+2}) y los grupos carboxilo de las pectinas en medios con pH entre 3.2 a 4 (Coma, 2013). El calcio tiene la habilidad de formar enlaces complejos insolubles con los carboxilos libres de las cadenas pécticas, formando así una red tridimensional, esta fuerte interacción se forma como consecuencia de la unión del calcio con los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilos de la pectina (Figura 1.11).

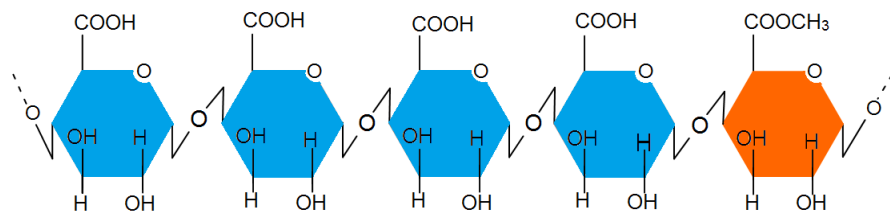


Figura 1.11. Pectina de Bajo metoxilo (PBM) poseen un GE<50 %.

1.7. Cuantificación de pectinas por el método colorimétrico m-hidroxibifenil

La metodología para la cuantificación de pectinas implica un proceso de extracción y purificación para posteriormente llevar a cabo una determinación la cual se realiza mediante diferentes técnicas, siendo los métodos colorimétricos los más usados debido a su mayor afinidad con respecto a las técnicas volumétricas y gravimétricas, y su realización resulta más sencillas en comparación de las téc-

nicas cromatográficas y electroforéticas. Entre las metodologías colorimétricas para la cuantificación de pectinas se encuentran los métodos de carbazol y del m-hidroxibifenil. Ambas metodologías se fundamentan en la reacción del ácido 5-formil-2-furanocarboxílico, resultante de la acción en caliente mediante el ácido sulfúrico sobre el ácido galacturónico, con ayuda de un reactivo colorimétrico para obtener un producto coloreado que se absorbe a una determinada longitud de onda (Barazarte *et al.*, 2010).

1.7.1. Sólidos Insolubles en Alcohol (SIA) y Pectina Total (PT)

El análisis de las sustancias pécticas en tejidos de origen vegetal involucra una extracción fraccionaria, esto es de acuerdo a la disolución en diferentes solventes a partir de los sólidos insolubles en alcohol (SIA): la fracción soluble en agua, la cual representa a las pectinas de alto metoxilo; la fracción soluble en oxalato la cual es representativa de las pectinas de bajo metoxilo; y por último a la fracción soluble en álcali que comprende a las protopectinas. Se puede cuantificar el total de pectina presente en un fruto u hortaliza a partir del método del m-hidroxibifenil el cual tiene mayor afinidad con respecto al ácido anhidrogacturónico característico en pectinas a partir de fuentes de origen vegetal, comúnmente se ocupa un blanco para cada muestra para evitar y corregir alguna contaminación o interferencias que pueda existir durante la metodología (Stückrath *et al.*, 2008).

1.8. Caracterización de Pectinas

La caracterización de las pectinas permite identificar y evaluar detalladamente las características de las mismas, como lo son sus propiedades fisicoquímicas (grado de esterificación, contenido de metoxilo, peso equivalente, contenido de ácido anhidrogacturónico y grado de esterificación) las cuales se detallaran a continuación.

1.8.1. Contenido de Metoxilo

El contenido de metoxilo (%) se refiere a la cantidad de ésteres metilados, es decir, el número de residuos de AGA esterificado o metoxilados por metanol (CH_3OH) sobre el total de ellos (Figura 1.12). Esta determinación se da a partir de

la saponificación de la pectina y la titulación de los grupos carboxilos libres (Figura 1.13). Asimismo, es un factor importante que interviene en el control del tiempo de formación del gel, la sensibilidad de los cationes polivalentes y su utilidad en la preparación de geles sólidos, películas y fibras (Ranganna, 1986).

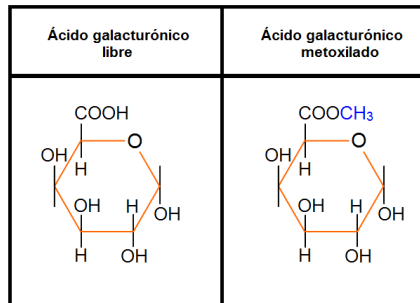


Figura 1.12. Ácido D-galacturónico con grupos carboxilos libres y grupos ésteres metilados.

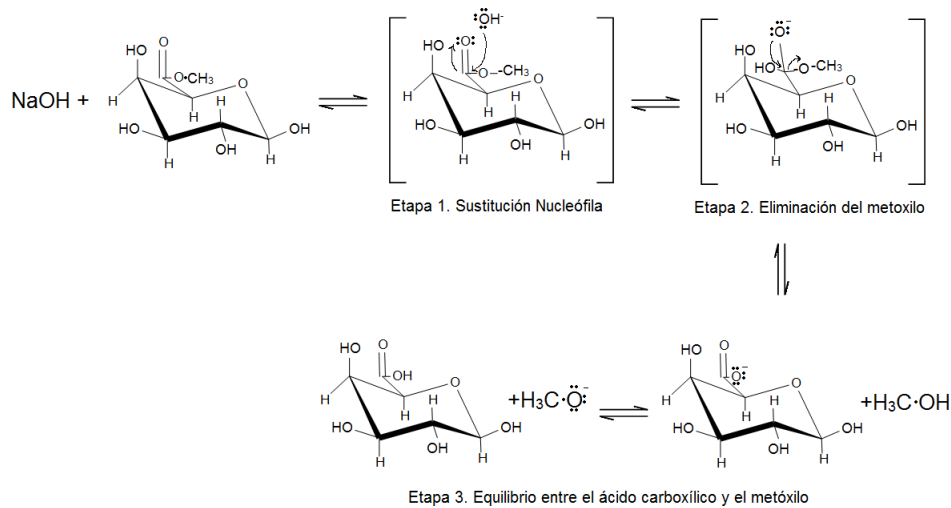


Figura 1.13. Reacción de mecanismo de saponificación del ácido D-Galacturónico (Allinger, 1978).

1.8.2. Peso Equivalente

El peso equivalente se utiliza para calcular el contenido de cadenas de AGA así como es necesario para obtener el grado de esterificación en pectinas (Rangan-

na, 1986). El peso molecular de estos compuestos se encuentra entre 20,000 g/mol a 300,000 g/mol. Asimismo, se encuentra relacionado con la longitud de la cadena, es una característica muy importante de la que dependen la viscosidad de sus disoluciones y su comportamiento en la gelificación o formación de jaleas (Ortuño, 1999; Owens *et al.*, 1948). La estructura de la pectina está constituida por monómeros de ácido D-galacturónico, molécula que representa el grupo funcional carboxilo (-COOH), por lo tanto el peso equivalente representa el número de carboxilos libres que reaccionan con la base adicionada (NaOH) de tal forma que sufre separación protónica debido a la acción de la base (Figura 1.14).

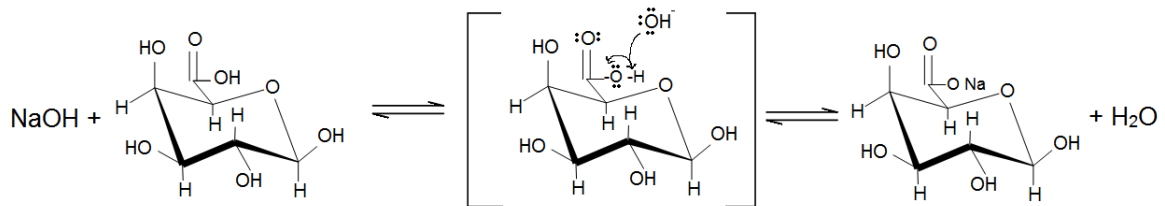


Figura 1.14. Reacción de la molécula de ácido D-galacturónico con NaOH.(Allinger, 1978).

1.8.3. Contenido de Ácido Anhidrogalacturónico

La pectina, que se esterifica parcialmente, contiene el 10 % o más de material orgánico compuesto de arabinosa, galactosa y algunos azúcares. El contenido de Ácido Anhidrogalacturónico es esencial para determinar la pureza de las pectinas y su grado de esterificación, asimismo permite evaluar las propiedades físicas de las mismas (Ranganna, 1986).

1.8.4. Grado de Esterificación

Existen características químicas propias de las pectinas las cuales influyen en la fuerza del gel, estas son el grado de esterificación y el peso molecular (PM); por lo tanto, el grado de esterificación es un factor clave para determinar la conformación y las propiedades reológicas de las pectinas (Hwang *et al.*, 1992). Asimismo, dependerá de la fuente original y del método utilizado para su extracción de la pectina. Los grupos carboxilos de los ácidos galacturónicos presentarán un grado variable

de esterificación con metanol y a su vez pueden estar parcial o completamente neutralizados por iones de sodio, potasio o amonio (Turquois & Heyraud, 1999).

1.9. Identificación de Pectina por Espectrofotometría (FT-IR)

La técnica de adquisición de datos por Transformada de Fourier en el Espectro Infrarrojo (FT-IR) ha revolucionado los métodos de análisis y el manejo de las muestras. Se sabe que esta técnica resulta alternativa para el análisis de alimentos, ya que resulta una herramienta para describir y explicar los fenómenos que presenta un alimento durante su procesamiento (Rosas-Mendoza & Fernández-Muñoz, 2012). La FT-IR requiere una máxima precisión, ya que los espectros que proporciona poseen un grado de selectividad en cuestión de los análisis cuantitativos para lo cual es requerido principalmente (Skoog *et al.*, 1997). La espectrofotometría por infrarrojo con transformada de Fourier es una técnica instrumental que nos permite caracterizar pectinas (Figura 1.15) de acuerdo al grado de esterificación que presenten, esto es debido a la localización de bandas de absorción las cuales se originan por modos de vibración específicos de grupos de átomos en el ácido galacturónico (AGA) y en los ésteres metilados, respectivamente (Chasquibol, 2010).

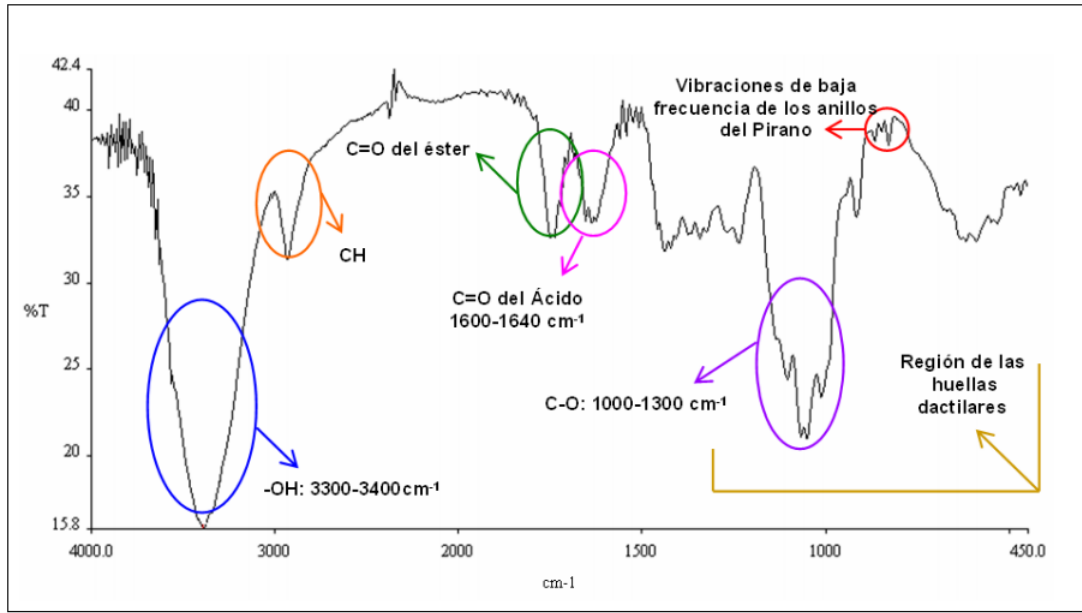


Figura 1.15. Espectro IR de una pectina estándar. Fuente: (Guzmán & Suárez, 1975)

1.10. Técnicas de Extracción

Se considera a la extracción como el proceso del aislamiento de diferentes tipos de compuestos bioactivos presentes en productos vegetales. Para poder llevar a cabo de forma ideal dicho proceso, los métodos de extracción deben poseer características cuantitativas asimismo deben considerarse ahorradores de tiempo y energía (Puri *et al.*, 2012). Es considerada una operación unitaria, esto debido a que un componente se separa o elimina mediante el contacto con otro material o fase, que tiene mayor afinidad por él, el resto de los componentes, en cambio, permanecen en la pared celular (Páez *et al.*, 2005).

1.10.1. Técnicas de extracción convencionales

La mayoría de estas técnicas se basan en la extracción mediante diferentes disolventes y la aplicación de calor y/o la mezcla de estas variables. Con el fin de obtener compuestos bioactivos a partir de tejidos vegetales, entre estas técnicas se encuentran principalmente la Extracción Soxhlet, la Maceración, la Hidrodestilación y las Extracciones ácidas. Este tipo de técnicas son usadas tradicionalmente ya

que se basan en el uso de solventes, temperaturas altas y agitación, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa (Azmir *et al.*, 2013).

1.10.1.1. Extracción por medios ácidos (Hidrólisis Ácida)

Se sabe que la pectina es un ácido con un pH de aproximadamente 3.5, principalmente se extrae tratando la materia prima con ácidos minerales (ácido sulfúrico, fosfórico, nítrico, clorhídrico o cítrico) tratados a altas temperaturas y en medios con pH's bajos ya que bajo estas variables los enlaces glucosídicos se rompen con mayor facilidad que en medios alcalinos. El intervalo de tiempo varía con la materia prima y el tipo de pectina deseada. Las condiciones normales de temperatura se encuentran entre 50 °C a 96 °C, pH de 1 a 3 (el pH bajo disocia las uniones iónicas). Después de la concentración, los precipitados de pectina se dan a partir de la adición de alcohol. Se considera el 2-propanol el más apropiado para llevar a cabo los precipitados. Para la aplicación de alcohol se usa un rango entre 60 y 80 % en relación al total de la concentración de pectina líquida obtenida (Silva *et al.*, 2008). El mecanismo químico que ocurre durante la hidrólisis ácida refiere a la ruptura de carbohidratos (ruptura en los enlaces α -1,4 formando así la estructura péctica la cual se encuentra conformada por la unión de varios ácidos galacturónicos con grupos esterificados o no).

1.10.2. Técnicas de extracción no convencionales

Los métodos no convencionales resultan ser más amigables con el ambiente, ya que estos disminuyen el uso de productos químicos y orgánicos, se pueden optimizar las variables de extracción (tiempo y temperatura) así como mejorar la calidad del extracto. Estas técnicas han tomado interés durante los últimos 50 años. Para mejorar el rendimiento de la muestra y la selectividad de los compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales, los ultrasonidos (Ghafoor *et al.*, 2009; Vinatoru & Mason, 1997), los campos eléctricos pulsantes (Toepfl *et al.*, 2006), la digestión enzimática (Gaur *et al.*, 2007), la extracción por microondas (Kaufmann & Christen, 2002), los fluidos supercríticos (Esquivel & Aguilar, 2007), entre otros, han sido estudiadas como métodos no convencionales.

1.10.2.1. Extracción por Ultrasonido

En la actualidad se han desarrollado tecnologías las cuales disminuyan el uso de disolventes y optimicen el proceso, dentro de éstas encontramos a los Ultrasonidos (US). Esta tecnología se le considera emergente (Chemat et al., 2011; Joyce & Mason, 2008) ya que permite la aceleración en la transferencia de masa y energía, debido a que interaccionan con el material provocando la alteración de sus propiedades fisicoquímicas (Figura 1.16).



Figura 1.16. Procesador Ultrasonico.

■ Generalidades de los Ultrasonidos

Existen diferentes energías en la naturaleza, una de ellas es la energía acústica. Los sonidos son oscilaciones mecánicas en el tiempo que tienen lugar en el seno del material por el que se propagan. Las ondas acústicas al ser elásticas, necesitan un medio material para su propagación. A diferencia de las ondas electromagnéticas, estas no poseen la capacidad de transmitir a partir del vacío. Los ultrasonidos son las ondas acústicas de frecuencia superior al límite de audición humano (20 kHz) (Raj *et al.*, 2004). Se sabe que si los ultrasonidos se aplican con una potencia suficiente es posible afectar a un determinado proceso, un producto o una reacción química, la mayoría de estos son producidos por efectos del fenómeno conocido como *cavitación*.

■ Tipos de Ultrasonidos

Las ondas acústicas se pueden clasificar en función de la frecuencia (Figura 1.17). Normalmente se toma como referencia la audición humana la cual cubre los rangos entre los 20 Hz y los 20 kHz, por el límite en el que éstas se encuentran se le denominan ondas sónicas. Se denominan ondas subsónicas o infrasonidos, a las ondas

que se encuentran por debajo de los 20 Hz. Las ondas que se encuentran por encima de los 20 Hz reciben el nombre de ultrasónicas (Mason, 1998). Es importante añadir que las frecuencias se dividen en tres partes: los ultrasonidos de potencia o de alta intensidad (20-100 kHz), los ultrasonidos de alta frecuencia (100 kHz-1 MHz) y por último tenemos a la ecografía de diagnóstico la cual va de 1-500 MHz.

Por otra parte, existe otra clasificación a partir de sus aplicaciones industriales (McClements & Gunasekaran, 1997), esta clasificación se divide en dos grupos, ultrasonidos de alta potencia o de intensidad y los ultrasonidos de señal o de baja potencia. El primer grupo abarca frecuencias entre 20 y 100 kHz e intensidades superiores a 1 W/cm^2 , el segundo grupo se caracteriza por utilizarse en frecuencias que oscilan entre los 100 kHz y los 20 MHz e intensidades inferiores a 1 W/cm^2 .

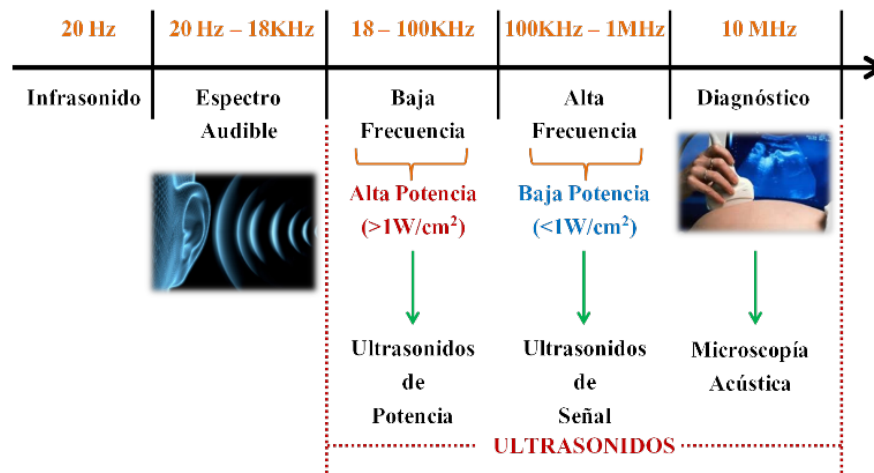


Figura 1.17. Clasificación del sonido en función de la frecuencia.

■ Ultrasonidos de Alta Intensidad

Los ultrasonidos de potencia, también llamados de alta intensidad, que se caracterizan por tener unas frecuencias que oscilan entre los 20 y 100 kHz e intensidades superiores a 1 W/cm^2 . Su uso es común cuando se desea que un sistema se modifique químicamente o se desee cambiar una estructura química o física, esto se debe al fenómeno conocido como *cavitación* (Pilli *et al.*, 2011; Rastogi, 2011). Normalmente, se aplican mediante ondas continuas, aunque también se pueden aplicar en forma de pulsos.

■ Cavitación

Uno de los efectos más significativos de los ultrasonidos es el fenómeno que produce llamado *cavitación*. El cual se produce en aquellas regiones de un líquido sometido a presiones de alta amplitud las cuales alternan rápidamente. Cuando los ultrasonidos se aplican sobre medios líquidos, las ondas ultrasónicas provocan dos tipos de sucesiones cíclicas, una de expansión y otra de compresión las cuales son emitidas por vibraciones mecánicas (Tang, 2003). Las ondas cíclicas de compresión ejercen una presión positiva y empujan las moléculas del líquido en un mismo sentido, mientras que los ciclos de expansión ejercen una presión negativa y orientan a las moléculas en sentidos contrarios (Vajnhandl & Le Marechal, 2005). El resultado que generan estas ondas cíclicas es la formación ininterrumpida de microburbujas, cuyo diámetro aumenta hasta 1000 veces su tamaño original en la alternancia durante los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico colapsan para volver al tamaño original. Cuando esto ocurre se libera toda la energía acumulada, provocando un elevado aumento de temperatura instantáneamente. Sin embargo, la energía liberada, así como el choque mecánico asociadas al fenómeno de implosión, afectan la estructura de las células situadas en el microentorno. Se considera que dependiendo de la frecuencia empleada y la longitud de las ondas de sonido, se pueden generar diferentes cambios físicos, químicos y bioquímicos (Herrero & de Avila, 2006) (Figura 1.18).

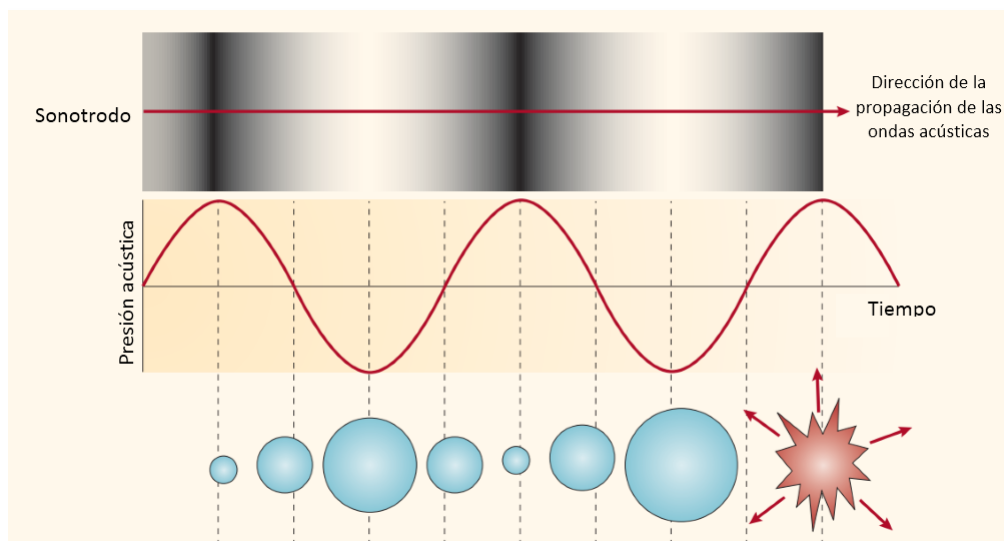


Figura 1.18. Fenómeno de la cavitación y formación de microburbujas.

■ Sonda Ultrasónica

Estos sistemas se basan en la transmisión al medio de la energía ultrasónica que produce el transductor mediante una sonda metálica. El sistema consta de un generador que produce una señal eléctrica, a la frecuencia y potencia deseadas, un transductor piezoeléctrico que transforma la energía eléctrica en acústica, y una sonda que transmite esta energía acústica al medio a tratar. La intensidad de la onda emitida, es decir la amplitud de vibración de la punta de la sonda, se puede controlar alterando la potencia suministrada por el generador. Prácticamente todos los equipos disponen de un control de potencia de este tipo y la posibilidad de aplicar la señal en forma de pulsos. Para aplicaciones en líquidos, una sonda de forma cilíndrica se limita a transmitir la señal acústica producida por el transductor al medio a tratar. La *cavitación* que se genera en el medio produce un gran estrés mecánico que ocasiona la erosión de la punta de la sonda. De esta manera, se forman irregularidades en la superficie de la sonda que impiden la correcta emisión de ondas planas. Debido a este fenómeno, se producen varias ondas que se anulan parcialmente entre sí. Esto supone una pérdida de eficacia en la generación y la emisión de ultrasonidos. Por otra parte, la erosión también produce la disminución de la longitud total de la sonda que deja de ser un múltiplo de media longitud de onda. Como consecuencia, el sistema deja de estar optimizado geométricamente y la intensidad emitida decae (Cárcel *et al.*, 2007).

1.10.3. Aplicación de los Ultrasonidos de Alta Intensidad para la obtención de Pectinas

La extracción de compuestos de interés a partir de fuentes vegetales, asistida con ultrasonidos, se describe como un proceso el cual utiliza la energía acústica y diferentes tipos de solventes. Este proceso acústico se ha reportado como más ventajoso que el emplear procesos como extracción con fluidos supercríticos, microondas y extracción acelerada con solventes.

2. METODOLOGÍA

2.1. Plan de trabajo

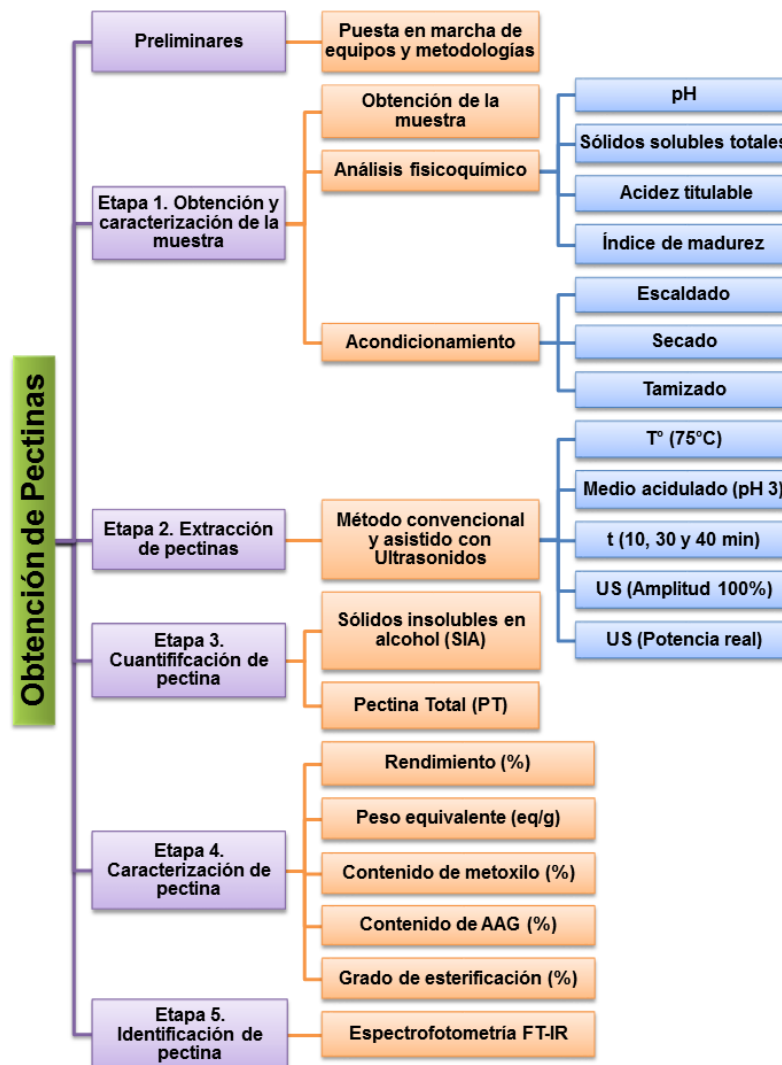


Figura 2.1. Diagrama de Plan de trabajo.

2.2. Diseño de Experimentos

El diseño de experimentos que se muestra en la Tabla 2.1 refiere a las variables utilizadas para la obtención de pectina a partir de la extracción convencional (Hidrólisis Ácida) y asistida por USAI se describe a continuación:

Tabla 2.1. Diseño de experimentos.

Tratamiento	Tiempo (min)	T (°C)	pH	Medio acidulado	Amplitud
HA	10	75	3	Ácido Cítrico	NA
	30				
	40				
HAUS	10	75	3	Ácido Cítrico	100 %
	30				
	40				

2.3. Etapa 1. Obtención y caracterización de la muestra

2.3.1. Obtención de la muestra

Para el presente estudio se analizó un lote de guayaba variedad Media China el cual se obtuvo en un mercado local del estado de Puebla. Ya que el presente trabajo busca disminuir el impacto ambiental que la materia prima (guayaba) fuera de norma produce cuando se genera a gran escala y es por ello que las muestras fueron seleccionadas en función a que no cumplieran con las condiciones aptas según a lo establecido por la normativa del CODEX STAN 215-1999 (Commission *et al.*, 2007) y la NMX-FF-040-SCFI-2002 (SE, 2002), dichas especificaciones se ven indicadas en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Especificaciones por normativa de las características de la muestra (guayaba).

Especificaciones por normativa	Especificaciones de muestra utilizada (guayaba)
Enteras.	Enteras y/o fraccionadas.
De consistencia firme.	No presentan consistencia firme (Mallugaduras).
De forma, color, sabor y olor característico del tipo.	No presentan forma, color y olor característico (olor fermentado).
Sanas excluyéndose todo producto afectado por podredumbre o que esté deteriorado de tal modo que no sea propio para el consumo.	Presentan características de podredumbre o no aptas para el consumo.
Limpias, prácticamente exentas de material extraño visible.	Sucias, con material extraño adherido a la dermis.
Exentas de manchas.	Presentan manchas negras y cafes.
Exentas de daños causados por microorganismos.	Presentan daños causados por microorganismos.
Exentas de imperfecciones marcadas.	Presentan imperfecciones.
Exentas de humedad externa anormal.	Presentan humedad (sudadas).
Suficientemente desarrolladas y presentar un estado de madurez satisfactorio que permita: <ul style="list-style-type: none"> ■ Resistir las prácticas de manejo y transporte ■ Llegar a su destino en condiciones satisfactorias para su comercialización. ■ Asegurar un estado de madurez satisfactorio que corresponda a las características propias del tipo. 	Su estado de madurez no le permite: <ul style="list-style-type: none"> ■ Resistir las prácticas de manejo y transporte ■ Llegar a su destino en condiciones satisfactorias para su comercialización. ■ Asegurar un estado de madurez satisfactorio que corresponda a las características propias del tipo.

2.3.2. Índice de madurez, pH, ácida titulable y sólidos solubles totales

Para el análisis de índice de madurez se analizaron la cantidad de 5 muestras (guayabas enteras), elegidas al azar del lote total (150-170 piezas, aproximadamente). Asimismo, se necesitaron dos parámetros, la cantidad de ácido predominante

(%) presente en la muestra (acidez titulable) y la cantidad de sólidos solubles totales (°Brix). Para el primer parámetro se utilizó la metodología descrita por la AOAC (AOAC, 2000), se hizo una dilución de 10 mL de la muestra molida (10 %) y agua destilada (90 %), antes de llevar a cabo la titulación con Hidróxido de sodio al 0.1 N se le añadieron tres gotas de fenolftaleína como indicador, este proceso se realizó a tres muestras por duplicado. Para el segundo parámetro con ayuda de un refractómetro digital (PAL-1, Atago, China) se analizó la misma cantidad de muestras que en el análisis anterior (3 muestras) por duplicado tomando la cantidad de 1 mL aproximadamente y esperando aproximadamente 3 segundos para que el refractómetro diera la lectura de los °Brix correspondientes. Para poder llevar a cabo los cálculos necesarios fueron necesarias la Ecuaciones 2.1 y 2.2.

Para llevar a cabo la medición del pH de la muestra (guayaba fresca), para ello se molió y filtro la muestra para retirar las semillas. La medición se llevó a cabo con ayuda de un potenciómetro (UB-10, Denver Instruments, Colorado, USA), se colocó aproximadamente 5 gramos de muestra molida y filtrada en un vaso de precipitado de 100 mL, la metodología se llevó a cabo por triplicado.

- Para calcular el Índice de madurez se utiliza la Ecuación 2.1

$$\text{Índice de madurez} = \frac{\text{°Brix}}{\% \text{ Acidez}} \quad (2.1)$$

- Para calcular el % de acidez se utiliza la Ecuación 2.2

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(\text{Vol.gastado NaOH}) \times (N \text{ del NaOH})}{\text{Vol.utilizado de muestra}} \quad (2.2)$$

2.3.3. Acondicionamiento

Las guayabas fueron escaldadas para inactivar las enzimas presentes en las mismas, para llevar a cabo el proceso de escaldado, las muestras fueron sumergidas en agua a una temperatura de 100 °C durante 5 minutos para posteriormente ser almacenadas a 5 °C. Posteriormente, se descongelaron a temperatura ambiente para poder manipularlas. Las guayabas se cortaron en rodajas (espesor de 5 mm) y se secaron en un horno de fujo convectivo (RE53UL, BINDER, Alemania) a una

temperatura de 40 °C hasta llegar a un peso constante y así reducir la cantidad de agua disponible en el fruto. En seguida, la muestra se molió y tamizó reduciéndola a un tamaño de partícula de 500 µm. El polvo se almacenó en frascos de vidrio herméticos a temperatura ambiente (25 °C) bajo condiciones de ausencia de luz, hasta su uso posterior.

2.4. Etapa 2. Extracción de Pectinas

2.4.1. Extracción por HA

Para llevar a cabo la extracción de pectina por HA, se siguió el método utilizado por (Ahmad & Rongen, 2014). Se pesaron 5 gramos de muestra anteriormente acondicionada en una balanza analítica (ES12CA, Precisa, Suiza). Se llevaron a un vaso de precipitado de 500 mL y posteriormente se agregaron 250 mL del medio acidulado, para ello se utilizó la cantidad de ácido cítrico necesaria para que se produjera un medio con un pH de 3 respectivamente con ayuda de un medidor potenciómetro (UB-10, Denver Instruments, Colorado, USA). Durante la extracción se manejaron diferentes tiempos (10, 30 y 40 minutos) y una temperatura de 75 °C a agitación constante en una parrilla eléctrica (Cimarec SP131015, Thermo Scientific, USA). Las soluciones resultantes se filtraron con ayuda de una tela y se llevaron a una temperatura de 4 °C para evitar una degradación de la pectina producida por calor. El producto resultante se precipitó con etanol (1:1) dejándolo en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente (25 °C). La pectina se dejó secar en un horno a una temperatura de 50 °C durante 3 horas. Finalmente se molió con ayuda de un mortero.

2.4.2. Extracción por HAUS

Para esta metodología se utilizaron 5 gramos de muestra anteriormente acondicionada. Se llevaron a un recipiente enchaquetado o reactor aproximadamente de 100 mL. Las variables que se tomaron en cuenta para llevar a cabo la extracción fueron el tiempo de extracción (min), la temperatura (°C), un medio acidulado con un ajuste de pH de 3 con ayuda de un medidor potenciómetro (UB-10, Denver Instruments, Colorado, USA) y se manejó una amplitud del 100 % para el sonicador.

Posteriormente la muestra se sometió al proceso de extracción usando un sonicador (UP400S, Hielscher Ultrasound Technology, USA) con un sistema tipo sonda a una amplitud del 100 % durante los tiempos de (10, 30 y 40 minutos), asimismo durante la extracción se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C, para mantener esta temperatura se utilizó un baño de recirculación de agua (AD07R-20, PolyScience, USA). Después de la extracción asistida con ultrasonidos, la solución péctica resultante se filtró con ayuda de una tela y se llevó a una temperatura de 4 °C para evitar una degradación de la pectina producida por calor. El producto resultante se precipitó con etanol (1:1) dejándolo en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente (25 °C). La pectina se dejó secar en un horno a una temperatura de 50 °C durante 3 horas. Finalmente se molió con ayuda de un molino (Figura 2.2)

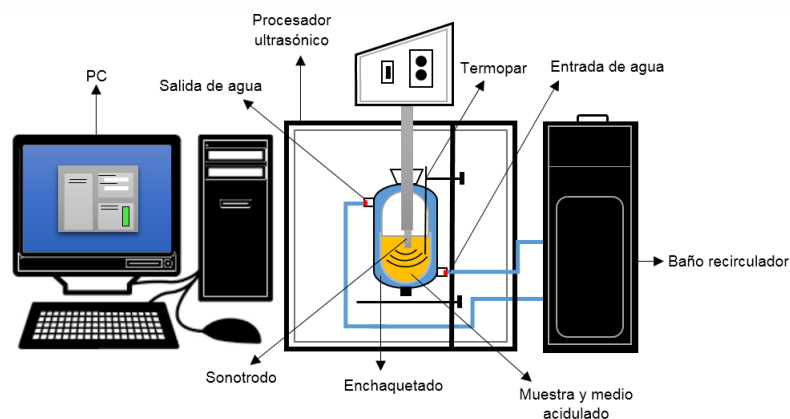


Figura 2.2. Diagrama de obtención de pectinas mediante HAUS.

2.4.2.1. Caracterización de los parámetros ultrasónicos

Para llevar a cabo la caracterización de los parámetros ultrasónicos utilizados para la extracción de pectinas a partir de HAUS se llevó a cabo la evaluación de la potencia entregada por el sonicador al medio (calorimetría), para la cual se tomaron las variables utilizadas para la extracción. Se hizo una calibración en el equipo y un vaso de precipitado de 500 mL, se colocaron en el mismo 250 mL de medio acidulado con ácido cítrico y agua desionizada y se añadieron 5 gramos de la muestra (guayaba seca), posteriormente se introdujeron al programa las condiciones para llevar a cabo la calorimetría (una amplitud del 100 % y un tiempo de 3 minutos). Finalmente se graficaron los resultados obtenidos a partir de la calori-

metría. El cálculo para obtener la potencia real ultrásónica se realizó a partir de la Ecuación 2.3 con base a la pendiente obtenida por la curva temperatura-tiempo realizada experimentalmente.

$$P = M \times Cp \times \frac{dT}{dt} \quad (2.3)$$

donde:

M= Es la masa del medio de extracción (kg)

Cp= Es el calor específico del mismo (J/kg °C)

dT/dt= Es el incremento de la temperatura del medio de extracción tratado por ultrasonidos.

2.5. Etapa 3. Cuantificación de pectinas por el método colorimétrico m-hidroxibifenil (SIA y PT)

La extracción de los SIA se llevó a cabo de acuerdo con el método de (Kintner & VanBuren, 1982). Se pesaron 2.5 gramos de muestra previamente homogeneizada y fueron introducidos en un tubo de centrifuga previamente pesado, se agregaron 15 mL de etanol absoluto e inmediatamente se agitaron con una varilla de vidrio. Posteriormente se colocó la muestra en un baño con agua en ebullición durante 10 minutos. A continuación se enfriaron en un baño de agua con hielo. Enseguida se usó una centrifuga refrigerada (320R, Hettich Lab Technology, Alemania) durante 10 minutos a 4 °C. Finalizada la centrifugación, el sobrenadante se desechó. Al precipitado se le agrego una vez más etanol y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. Finalmente, el mismo tubo de centrifuga con el precipitado se puso a secar en un horno por convección de calor (RE53UL, BINDER, USA) a 60 °C durante 24 horas para evaporar el etanol restante. Obtenidos los SIA se procedió a la determinación de la pectina total.

Para la determinación de Pectina total, se utilizaron 5 mg de SIA y fueron pesados en una balanza analítica, se agregaron 2 mL de H₂SO₄ concentrado y se dejó agitar 1 minuto. Después se agregaron 0.5 mL, gota a gota, de agua destilada y se dejó agitando durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo se agregaron otros 0.5 mL de la misma manera dejándose en agitación durante 30 minutos. Transcurrido

este tiempo la dilución resultante se filtró a vacío con fibra de vidrio y se enrasó a 25 mL con agua destilada.

Del extracto obtenido a partir de la pectina total y las fracciones pécticas se tomó 1.0 mL de muestra y se agregaron 6 mL de una disolución ácida de tetraborato de sodio (0.025 M) manteniendo baja la temperatura con un baño de agua con hielo. Posteriormente, se calentaron en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos y, finalmente, se dejaron enfriar en un baño de hielo. Se agregaron 0.1 mL de m-hidroxibifenil (0.15 %). Para cada una de las muestras se preparó una muestra blanco, a la cual se le agregaron 0.1 mL de Hidróxido de sodio al 0.5 % en lugar de m-hidroxibifenil. Los tubos fueron agitados con un vortex y se dejaron reposar 15 minutos para después medir la absorbancia de las muestras a 520 nm en un espectrofotómetro UV-visible (6405, JENWAY, Inglaterra). Los resultados fueron expresados en mg AGA/100 gramos de muestra seca.

2.6. Etapa 4. Caracterización de Pectinas

2.6.1. Rendimiento

El rendimiento de pectina obtenida se calculo a partir de la Ecuación 2.4.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso de pectina seca obtenido}}{\text{Peso de la muestra seca}} \quad (2.4)$$

2.6.2. Peso equivalente

El peso equivalente se determinó a partir del método propuesto por (Owens, 1952) a partir de una titulación con Hidróxido de sodio para obtener un pH de 7.5 usando rojo de fenol como indicador. Se pesaron 0.5 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se añadieron 5 mL de etanol. Se utilizaron 1.0 gramos de cloruro de sodio y se añadieron 100 mL de agua destilada. Finalmente se añadieron 6 gotas del indicador y se titularon con NaOH al 0.1 N. El punto de titulación se indicó con un vire color salmón. Esta solución neutralizada se almacenó para la determinación de contenido de metoxilo. El peso equivalente se calculó mediante la Ecuación 2.5. El PE epresenta el número de carboxílicos libres que reaccionan con la

base adicionada (NaOH), de tal forma que su grupo funcional carboxilo (-COOH), quien otorga las características ácidas a la molécula, sufre separación del protón debido a la acción de la base.

$$\text{Peso equivalente (eq/g)} = \frac{\text{Peso de la muestra} \times 1000}{\text{Vol.del alcali} \times N \text{ del alcali}} \quad (2.5)$$

2.6.3. Contenido de Metoxilo (MeO)

La determinación del contenido de metoxilo (MeO) se realizó utilizando el método de (Owens, 1952). La solución neutra obtenida a partir del peso equivalente se ocupó para esta determinación. Se añadieron 25 ml de Hidróxido de sodio (0.25 N). La solución se agito constantemente y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se añadieron 25 mL de ácido clorhídrico (0.25 N) y se tituló nuevamente con NaOH (0.1 N) llegando al mismo punto final, como en la titulación de peso equivalente. El MeO se calculó a partir de la Ecuación 2.6.

$$\text{Contenido de metoxilo (\%)} = \frac{\text{Vol.gastados de NaOH} \times 3.1}{\text{Peso de la muestra}} \quad (2.6)$$

donde:

Peso molecular del MeO= 31 mg/meq

2.6.4. Contenido de Ácido Anhidrogalacturónico (AAG)

Para llevar a cabo la metodogología descrita por (Owens, 1952) para determinar el contenido de ácido anhidrouónico el cual indica la pureza y el grado de esterificación que presentan las pectina obtenidas a partir de HA e HAUS,asimismo, permite evaluar las propiedades físicas de las mismas. Los resultados obtenidos por el contenido de metoxilo y el peso equivalente son necesarios para poder llevar a cabo la determinación del contenido de AAG, el cual se calculó con la Ecuación 2.7.

$$\text{AAG (\%)} = \frac{176 \times 0.1z \times 1000}{w \times 1000} + \frac{176 \times 0.1y \times 100}{w \times 1000} \quad (2.7)$$

donde:

Peso molecular del AAG= 176 mg/meq

z = ml gastados del alcali (NaOH) resultante del peso equivalente
 y = ml gastados del alcali (NaOH) a partir del contenido de metoxilo
 w = Peso de la muestra utilizada (guayaba seca escaldada)

2.6.5. Grado de Esterificación

El grado de esterificación se determinó por el método de (Ranganna, 1986) y se calculó a partir de la Ecuación 2.8.

$$\text{Grado de esterificación (\%)} = \frac{176 \times \%MeO}{31 \times \%AUA} \quad (2.8)$$

2.7. Etapa 5. Identificación de Pectina por Espectrofotometría (FT-IR)

Para llevar a cabo la identificación por análisis instrumental de los grupos funcionales propios de pectina obtenida a partir de HA e HAUS se ocupó un espectrofotómetro de infrarrojo (One FT-IR, Perkin Elmer Precisely, UK). Para llevar a cabo la caracterización se tomaron aproximadamente 100 mg de la muestra (pectina) y se depositaron en el plato del ATR anteriormente higienizado con etanol para evitar cualquier interferente en la lectura y posteriormente se seleccionó la punta correspondiente. Para rectificar que el plato del ATR estaba limpio el programa Spectrum realizó un Background indicando que efectivamente el plato se encuentra libre de cualquier contaminante. Se seleccionó la opción Instrument y se seleccionó la opción Monitor para checar la fuerza que aplicó la punta sobre la muestra la cual no debe pasar del 60 % ya que podría romper el lector del equipo. Se seleccionó la opción Scan dentro del menú y se checaron las condiciones del escaneo, se colocó el nombre de la muestra (pectina extraída por HAUS) y finalmente se seleccionó la opción Scan. Una vez que se realizaron las lecturas se entró al menú Process y se realizó la corrección de la línea base y la eliminación del ruido. Es necesario que la muestra (pectina) se encuentre seca o libre de agua ya que el espectrómetro puede incluir los grupos funcionales propios del agua en la lectura.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de los parámetros ultrasónicos

Como se menciona en el apartado 2.5.2.1 que corresponde a la metodología, se llevó a cabo una calorimetría para determinar la potencia real entregada por el equipo de ultrasonido al medio de extracción (agua acidulada con ácido cítrico; pH 3). En el presente estudio se obtuvo una potencia real de 95 ± 6.41 W, esto quiere decir que los 400 W de energía eléctrica utilizada para el equipo se transformaron a una energía acústica de 95 W. Las ondas acústicas transmitidas por el equipo de ultrasonido tipo sonda permite una fácil penetración de las mismas hacia el medio llegando con facilidad a la muestra utilizada (guayaba seca escaldada). En la Tabla 3.1 se puede observar que para el presente estudio obtuvo una potencia real de 95 ± 6.41 W, esto quiere decir que las ondas acústicas transmitidas por el equipo ultrasónico tipo sonda permite una fácil penetración de las mismas hacia el medio llegando con facilidad a la muestra utilizada (guayaba seca escaldada).

Tabla 3.1. Variables para calcular la potencia real entregada por el equipo ultrasónico.

Amplitud (%)	Peso de la muestra (g)	Masa del disolvente (g)	Cp mezcla (J/gramo* °C)	dT/dt	Potencia real (W)
100	5.0003	255.02	4.12	0.09	95.91 ± 6.41

Valores promedio \pm desviación estándar (n=2).

En la Figura 3.1 se aprecia el gráfico obtenido a partir de la calorimetría, se puede observar el ajuste realizado a la misma obteniendo una R^2 de 0.9996 así como la regresión lineal obtenida a partir de la ecuación de la recta mostrada.

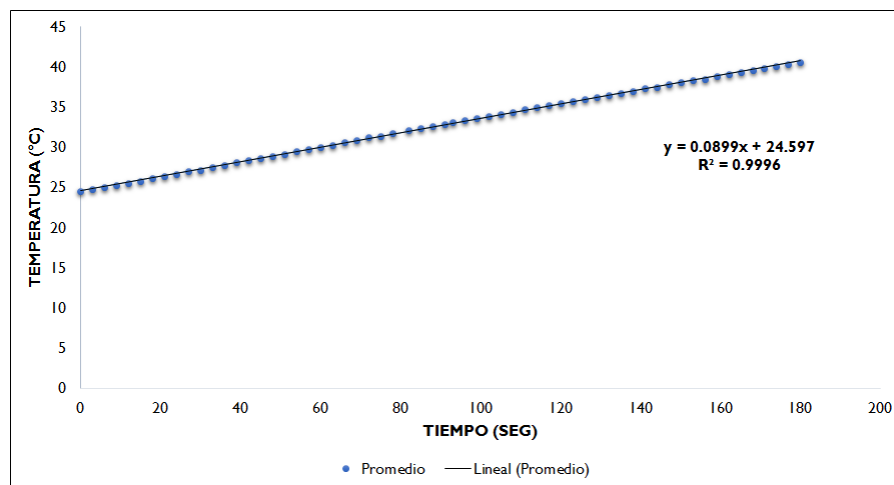


Figura 3.1. Calorimetría empleada para la determinación de potencia real aplicada por el sonicador al medio acidulado (t=3 minutos).

3.2. Cuantificación y Caracterización de pectinas obtenidas a partir de HA e HAUS

3.2.1. Características fisicoquímicas de la muestra utilizada

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de la guayaba se muestran en la Tabla 3.2. Los atributos fisicoquímicos evaluados en la muestra fueron pH, sólidos solubles totales (°Brix), índice de madurez, y acidez total. Los valores de pH demuestran que el fruto utilizado posee un pH ácido (3.40 ± 0.01) esto se debe a su composición rica en vitaminas ácidas como la Vitamina C, la variedad del fruto, el estado de madurez y el ácido predominante que en este caso es el cítrico. El pH obtenido a partir de guayaba variedad Media China coincide con los datos obtenidos por Solarte *et al.* (2010) quienes encontraron valores de pH de 3.41 en guayaba variedad Regional Blanca mientras que Torres & Castro (2009) encontraron un rango entre 3.90 ± 0.10 a 4.60 ± 0.20 , asimismo Marquina *et al.* (2008) obtuvieron valores que van 3.8 a 4.1. Por otro lado la acidez total titulable en el presente trabajo obtuvo un valor de 0.45 ± 0.01 % encontrándose por debajo de lo reportado por Torres & Castro (2009) quienes obtuvieron valores de 0.56 % a 0.96 %. Asimismo, Medina & Pagano (2003) reportaron valores de 2.48 ± 0.07 %. La cantidad

de sólidos solubles obtenidos (10.02 ± 0.01 °Brix) por refractometría se encuentran en el rango de los frutos maduros y sobremaduros (11.30 a 10.29 °Brix) según Solar-te *et al.* (2010) los cuales aumentan con la maduración del fruto así como el índice de madurez, propiciando una disminución con los ácidos presentes en el fruto. Así para el índice de madurez, el fruto utilizado presentó un valor de 22.06 ± 0.88 %, el cual se encuentran dentro del rango reportado por Solarte *et al.* (2010) el cual va de 18.83 % a 24.50 %.

Tabla 3.2. Atributos fisicoquímicos propios de la muestra utilizada

Muestra	pH	Sólidos solubles (°Brix)	% Acidez	Índice de madurez (%)
Guayaba variedad Media China	3.40 ± 0.01	10.02 ± 0.01	0.45 ± 0.01	22.06 ± 0.88

Valores promedio \pm desviación estándar (n=2).

3.2.2. Cuantificación de pectinas (SIA y PT)

Como se mencionó en el apartado 1.7 correspondiente a antecedentes, las pectinas están formadas principalmente por polímeros lineales de ácido galacturónico (AGA). Para poder determinar la pectina total se utilizó el método m-hidroxibifenil, así, se llevó a cabo una curva de calibración a partir de una solución estándar de 100 ppm de AGA. Los resultados obtenidos para la curva de calibración se presentan en la 3.3 y su representación gráfica se puede observar en la Figura 3.2.

Tabla 3.3. Concentraciones de AGA utilizados para la elaboración de curva de calibración

Solución estándar (ppm)	Absorbancia $\lambda= 520 \text{ nm}$
5	0,177±0,018
10	0,249±0,034
20	0,334±0,026
30	0,428±0,030
40	0,517±0,014
50	0,655±0,038

Valores promedio \pm desviación estándar (n=2).

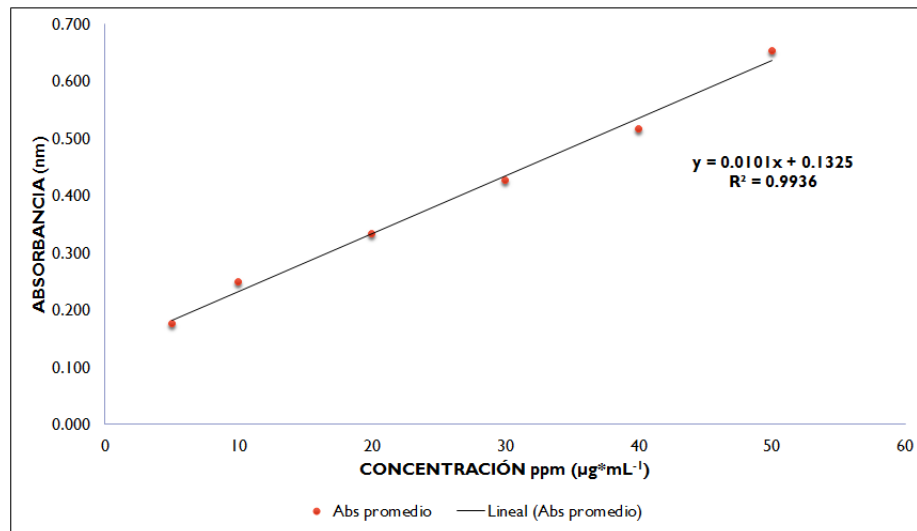


Figura 3.2. Gráfica a partir de las concentraciones de ácido galacturónico obtenidas.

La Figura 3.2 muestra el ajuste de las concentraciones, obteniendo una R^2 de 0.9936. Así, a partir de la ecuación de la recta se puede calcular mediante regresión lineal la concentración de pectina total dada por la absorbancia (λ) expresada en AGA/100 gramos de muestra seca. Sin embargo, para poder llevar a cabo la cuantificación de pectina total fue necesario realizar un pretratamiento a la muestra. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento de los sólidos insolubles en alcohol (SIA), los cuales servirán para posteriormente llevar a cabo el método del m-hidroxibifenil y poder cuantificar mediante espectrofotometría la cantidad de pectina total presente en la muestra, la cual representa el total de cadenas lineales de ácido galacturónico.

Tabla 3.4. Pectina total presente en guayaba con diferentes tratamientos

Muestra con diferentes tratamientos aplicados	Pectina total (g AGA/100g muestra seca)
Guayaba escaldada seca	12.789±137.276
Guayaba escaldada fresca	7.036±194.474
Guayaba sin escaldar seca	4.678±59.331

Valores promedio \pm desviación estándar (n=2). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

El contenido de pectina total (PT) obtenido a partir de los SIA muestran ciertas variaciones acorde al tratamiento aplicado a la guayaba. Podemos observar en la Tabla 3.4 que la muestra que mayor cantidad de pectina total posee es la muestra seca escaldada (12.789±0.13), esto se debe a que el tratamiento aplicado (presencia de calor) inactiva las enzimas como las pectasas (pectinmetilesterasa), las cuales catalizan la separación del alcohol metílico de la molécula de pectina, y la poligalacturonasa, que hidroliza los ácidos pécticos a ácidos poligalacturónicos de cadenas más cortas, por lo que el tratamiento al inactivarlas preserva el contenido de cadenas de AGA debido a que las enzimas no pueden actuar sobre el ácido galacturónico. A partir de los resultados obtenidos de la muestra seca escaldada (12.789±137.276 gramos AGA/100 gramos de muestra seca) se pudo observar que se encuentra por encima de los valores obtenidos por Carranza-Concha (2010) en uva blanca (0.347 gramos AGA/100 gramos de muestra fresca), así como los obtenidos por Stückerath *et al.* (2008) en frutos rojos que van de 0.1989 a 0.2052 gramos de AGA/100 gramos de muestra, no obstante los resultados obtenidos de PT resultaron más bajos que los reportados por Barazarte *et al.* (2010) en cáscaras de maracuyá los cuales resultaron ser de 15.81±0.60 en cáscara amarilla y de 16.50±0.62 en cáscara verde-amarilla.

3.2.3. Caracterización de pectinas

3.2.3.1. Rendimiento

Los resultados obtenidos para el rendimiento de la pectina en función del tiempo de extracción, tanto para la extracción convencional como la asistida con ultrasonidos se muestran en la Figura 3.3.

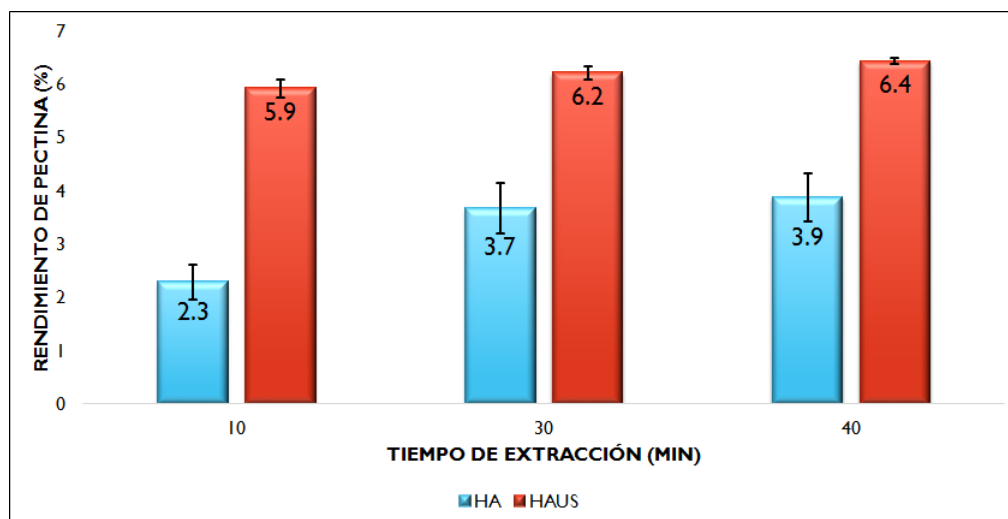


Figura 3.3. Rendimiento de pectina obtenido a partir de HA e HAUS.

Por un lado, se puede observar que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en función del tiempo de extracción para los tratamientos realizados con hidrólisis ácida y con ultrasonidos entre los 10 minutos (2.3 y 5.9 %, respectivamente) y los otros dos tiempos de extracción (30 y 40 minutos), por lo tanto, en base a los datos obtenidos para tiempos de extracción por arriba de los 30 minutos, se obtienen mayores rendimientos de pectina, así para muestras tratadas con hidrólisis ácida, los valores promedio obtenidos son de 3.8, mientras que para las tratadas con ultrasonidos los valores promedio son de 6.3. Por otro lado, se observaron que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos técnicas, ya que para el tiempo de 10 minutos a partir de una extracción por HA se observó un rendimiento de 2.3 ± 0.3 %, mientras que para el mismo tiempo de extracción, pero ahora con el tratamiento asistido por USAI, se obtuvo un 5.9 ± 0.2 %, por lo tanto, la diferencia entre ambos tratamientos fue del 61.02 %. Para los tiempos de 30 minutos, los valores de rendimientos obtenidos fueron de 3.7 ± 0.4 % para HA y 6.2 ± 0.1 % para HAUS, existiendo una diferencia del 40.33 %, finalmente, para el tiempo de 40 minutos, el rendimiento fue de 3.9 ± 0.4 % y 6.4 ± 0.1 %, para HA e HAUS, respectivamente, lo que dio una diferencia de 39.07 %. Por lo tanto, se observa que para todos los tiempos de extracción el rendimiento de pectina es mayor cuando el proceso es asistido con ultrasonidos, esto se debe a que la cavitación que surge durante la extracción provoca que las micro burbujas en el momento de su implosión generen la ruptura de las paredes

celulares permitiendo la migración de los compuestos de interés hacia el disolvente utilizado para su extracción y es así como existe una mayor transferencia de masa durante la misma (Chandrapala *et al.*, 2013).

En el presente estudio se obtuvieron valores de rendimiento de pectina obtenido mediante HA mayores a los reportados por Ahmad & Rongen (2014) en muestras de cáscara de guayaba los cuales fueron de 3.87 %, asimismo los reportados por Chacín & Marín (2010) los cuales se encuentran en un rango de 1.33 % a 1.65 %. Las variables como el pH, el tiempo de extracción, la temperatura resultan importantes para determinar el porcentaje de rendimiento total de pectina. Para la extracción convencional asistida con USAI, Minjares-Fuentes *et al.* (2014) reportaron mayores rendimientos de pectina obtenidos en muestras de bagazo de uva (29.4 %) extraídas a partir de un tratamiento convencional asistido con un baño ultrasónico. Asimismo, Wang *et al.* (2015) obtuvieron valores de rendimiento (27.46 %) en muestras de cáscara de uva por encima de los obtenidos en el presente trabajo. Es importante destacar que los compuestos bioactivos obtenidos mediante el tratamiento asistido con USAI pueden presentar características fisicoquímicas y estructurales similares (Figura 3.4) a los obtenidos por otros métodos de extracción convencionales (Hidrólisis ácida).

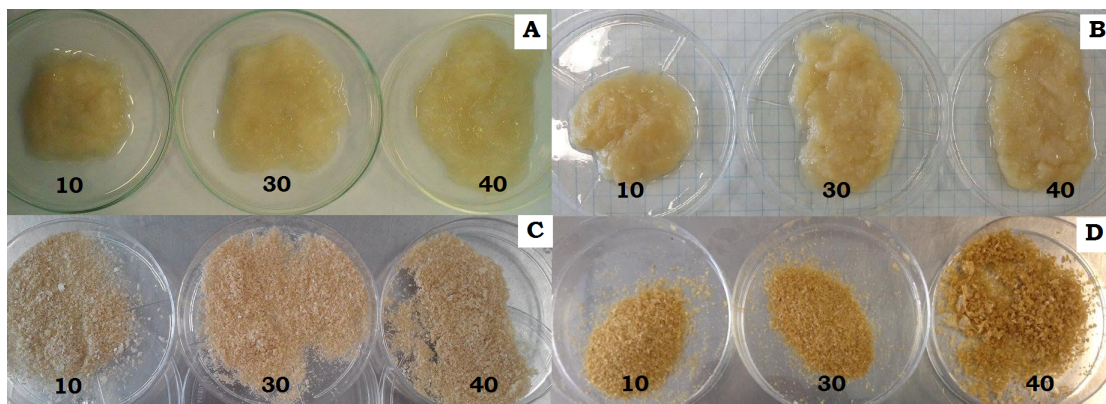


Figura 3.4. Pectinas húmedas obtenidas a partir de guayaba mediante HA., B: Pectinas húmedas obtenidas mediante HAUS., C: Pectinas secas obtenidas mediante HA., D: Pectinas secas obtenidas mediante HAUS, a los 10, 30 y 40 minutos de extracción

Entre más prolongado es el tiempo ultrasónico, puede implicar una cantidad mayor de compuestos obtenidos. Sin embargo, la cantidad de compuestos puede

llegar a disminuir con la aplicación de tiempos prolongados en conjunto con potencias ultrasónicas altas ya que resulta posible una degradación de compuestos debida a la onda ultrasónica ocupada. De acuerdo a los informes por (Li *et al.*, 2005), así como (Sivakumar & Pandit, 2001), la aplicación de potencias altas ultrasónicas tienen un efecto degradante. Las altas temperaturas producidas por los ultrasonidos disminuye la viscosidad y densidad del medio, así como aumenta la transferencia de masa, debido al aumento de burbujas producidas durante la *cavitación* y por lo tanto existe una mayor superficie de contacto (Palma & Barroso, 2002). Por lo tanto las altas temperaturas aplicadas durante la extracción asistida con USAI promueven una mayor eficiencia para la obtención de compuestos de interés.

3.2.3.2. Peso equivalente

El peso equivalente (PE) nos permite determinar el poder gelificante y la viscosidad de la pectina, ya que estas características están muy asociadas con el peso molecular y el tamaño de las cadenas pécticas (formadas por AGA). El PE a partir de pectinas obtenidas por HA y HAUS se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Determinación del peso equivalente (eq/g) de pectina obtenida a partir de guayaba

Tiempo de extracción (min)	Tratamiento	
	HAUS	HA
10	3194.65±120.10 ^{aB}	2276.92±103.38 ^{aA}
30	3264.11±120.47 ^{abB}	2544.71±75.28 ^{bA}
40	3583.86±256.30 ^{bB}	2784.05±154.35 ^{cA}

Valores promedio ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna muestran diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tiempos de extracción para un solo tratamiento. Diferentes letras (A, B, C) en la misma fila muestran diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos para un solo tiempo.

Para la extracción convencional el contenido de PE muestra diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tiempos de extracción (10, 30 y 40 minutos), ya que conforme éstos aumentan, el PE es mayor, así, los valores obtenidos para este tratamiento se encuentran en un rango de 2276.92±103.38 eq/g a 2784.05±154.35 eq/g, dichos valores resultan similares a los reportados por Chacín & Marín (2010) los cuales van de 871.21±354.34 eq/g a 2512.5±22.36 eq/g, y se encuentran por encima de

los reportados por Ahmad & Rongen (2014) (345.4 eq/g). El PE se encuentra asociado con la cantidad de grupos carboxilos libres que conforman la cadena de pectina y que los mismos aumentan con el estado de madurez del fruto. Asimismo, los resultados obtenidos a partir de HAUS, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de extracción. Se observa que para los tiempos de 10 y 30 minutos los valores obtenidos se encuentran entre 3194.71 ± 120.10 eq/g a 3264.1 ± 120.47 eq/g indicando que entre estos tiempos no existe diferencia significativa ($p < 0.05$), en cambio, para el tiempo de 40 minutos el PE fue de 3583.9 ± 256.30 eq/g, es decir, que a tiempos de extracción altos (>30 minutos) mayor la cantidad de PE (el efecto de los US generan reacciones, por lo que probablemente, se estén llevando a cabo reacciones químicas (sonólisis) que permitan tener mayor disponibilidad de compuestos). El aumento del PE tiene una influencia sobre propiedades físicas de las pectinas, como la viscosidad, la cual a su vez, se encuentra relacionada con la formación de geles, por lo que un alto peso molecular genera una pectina más viscosa, la cual facilita la formación del gel (Owens *et al.*, 1944).

El aumento en el PE a partir del tratamiento de HAUS en comparación de HA, se debe a que los USAI dentro de las aplicaciones que poseen cuando son aplicados a altas potencias se encuentra la despolimerización y cambios reológicos en los productos obtenidos, debido a que la pectina es un biopolímero el efecto que tienen las ondas ultrasónicas sobre ésta permite que se genere la ruptura de los enlaces que componen la pectina, dicho efecto permite obtener productos con características sensoriales y fisicoquímicas diferentes, motivo por el cual esta tecnología se utiliza en el desarrollo de nuevos productos (Delgado, 2015). Cabe destacar que este parámetro varía en un amplio intervalo dependiendo del método y la naturaleza del solvente utilizado para la extracción. Por un lado, un alto peso equivalente en pectinas tiene efectos positivos en la firmeza de geles que se puedan formar a partir de estas, y por otro lado un peso equivalente bajo podría tener efectos negativos como es la degradación parcial de la pectina.

3.2.3.3. Contenido de Metoxilo (MeO)

En la Tabla 3.6, se muestran los resultados obtenidos para la determinación del contenido de metoxilo de pectina obtenida a partir de la extracción convencional y la asistida por USAI en los diferentes tiempos de extracción.

Tabla 3.6. Determinación del contenido de metoxilo (%) de pectina obtenida a partir de guayaba

Tiempo de extracción (min)	Tratamiento	
	HA	HAUS
10	3.28±0.06 ^{aA}	4.03±0.06 ^{aB}
30	3.95±0.09 ^{bA}	4.23±0.03 ^{bB}
40	4.11±0.07 ^{bA}	4.55±0.09 ^{cB}

Valores promedio ± desviación estándar (n=3). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna muestran diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tiempos de extracción para un solo tratamiento. Diferentes letras (A, B, C) en la misma fila muestran diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos para un solo tiempo.

Por un lado, se observa que para la extracción por HA los valores obtenidos para los 10 minutos comparado con los otros dos tiempos, existen diferencias significativas ($p<0.05$) ya que se observa que para el tiempo de 10 minutos se obtuvo un valor de 3.28±0.06 % mientras que para los tiempos de 30 y 40 minutos los valores obtenidos fueron de 3.95±0.09 % y 4.11±0.07 % respectivamente. Los valores obtenidos a partir de HA en el presente estudio, resultaron similares a los reportados por Ahmad & Rongen (2014) en muestras de cáscara de guayaba (3.50 % a 4.25 %), y más bajos que los reportados por Chacín & Marín (2010) en diferentes variedades de guayaba (9.20 % a 9.40 %). Por otro lado, para HAUS los valores obtenidos demuestran diferencias significativas ($p<0.05$), ya que se observa que para el tiempo de 10 minutos (3.28±0.06 %) los valores resultaron más bajos en comparación que los tiempos de 30 y 40 minutos (3.95±0.09 % y 4.11±0.07 %). Para ambos casos el bajo contenido metoxilo puede deberse a que la pectina obtenida presenta cierta degradación en su estructura por actividad enzimática ya que proviene de una matriz vegetal con alto porcentaje de madurez. A pesar de que la muestra utilizada (producto fuera de norma) se sometió a un proceso de escaldado, no se sabe con claridad que porcentaje de actividad enzimático poseía. Como se mencionó anteriormente, las pectinas de bajo metoxilo forman geles en presencia de calcio u otros cationes divalentes en un amplio rango de pH, con o sin la presencia de azúcar. Las pectinas de bajo metoxilo tienen muchas aplicaciones en alimentos bajos en calorías y alimentos dietéticos (productos de confitería, mermeladas y productos lácteos) bajo determinados parámetros (pH y SST), asimismo, poseen aplicaciones en la industria farmacéutica (Chasquibol, 2010; García & García, 1985).

3.2.3.4. Contenido de Ácido Anhidrogalacturónico (AAG)

Los resultados obtenidos para la determinación del contenido de AAG en pectinas obtenidas a partir de HA e HAUS mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), asimismo como los tiempos de extracción para cada tratamiento. En la Tabla 3.7, se muestran los valores obtenidos para cada tratamiento a diferentes tiempos de extracción. Por un lado para la extracción convencional se muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada tiempo de extracción (10, 30 y 40 minutos), para el tiempo de 10 minutos se observan valores de 26.39 ± 0.61 % mientras que para los tiempos de 30 y 40 minutos no se observan diferencias significativas ($p < 0.05$). El porcentaje de AAG obtenido en el presente trabajo resultan por debajo de los reportados por Ahmad & Rongen (2014) (67.4 % a 82.1 %), asimismo, de los reportados por Chacín & Marín (2010) los cuales se encuentran del 50.48 ± 0.35 % a 51.54 ± 0.60 %. Por otro lado, el tratamiento convencional asistido por USAI demuestra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de extracción, se observa que para los tiempos de 10 y 30 minutos no existen diferencias significativas ya que para los valores fueron de 28.39 ± 0.40 % y 29.45 ± 0.21 % respectivamente, así para el tiempo de 40 minutos el contenido de AAG fue de 30.74 ± 0.81 %.

Tabla 3.7. Determinación del contenido de AAG (%) de pectina obtenida a partir de guayaba

Tiempo de extracción (min)	Tratamiento	
	HAUS	HA
10	28.39 ± 0.40^{aB}	26.39 ± 0.61^{aA}
30	29.45 ± 0.21^{aB}	29.32 ± 0.42^{bA}
40	30.74 ± 0.81^{bA}	29.68 ± 0.53^{bA}

Valores promedio \pm desviación estándar ($n=3$). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de extracción para un solo tratamiento. Diferentes letras (A, B, C) en la misma fila muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para un solo tiempo.

Como se menciona en el apartado 1.8.5 de antecedentes, el AAG nos permite identificar la pureza de la pectina extraída, en este estudio el bajo contenido de AAG en las pectinas obtenidas puede deberse a la presencia de azúcares neutros los cuales están unidos a la cadena principal del AGA por uniones glicosídicas 1,2, asimismo estos azúcares causan ramificaciones o plegamientos en las moléculas y se dificulta que se alineen e interactúen para formar zonas de unión, dichos azúcares

posiblemente se encuentran a partir de la precipitación de la pectina por etanol. Otro factor en el bajo contenido de AAG puede deberse a la presencia de altas cantidades de proteínas solubles (Ahmad & Rongen, 2014).

3.2.3.5. Grado de esterificación (GE)

El GE se refiere al número de grupos carboxilo esterificados ($-\text{COOCH}_3$) por 100 grupos de AGA, esto nos permite distinguir dos grupos de pectinas: las pectinas fuertemente metiladas o de alto metoxilo cuyo contenido de ésteres metílicos es superior al 55 % y las pectinas débilmente metiladas con un contenido menor de ésteres metílicos los cuales se encuentran alrededor del 45 %. Los resultados obtenidos para el grado de esterificación obtenidos en el presente trabajo se pueden apreciar en la Figura 3.5.

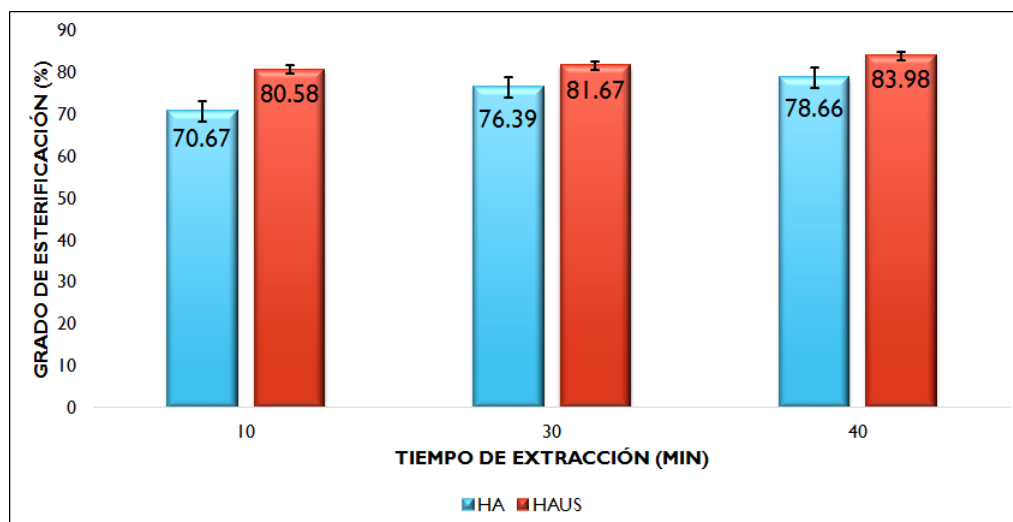


Figura 3.5. Porcentaje del grado de esterificación de pectina obtenida a partir de HA e HAUS.

Para el GE obtenido a partir de la extracción convencional (HA) se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tiempo de extracción de 10 minutos comparado con los tiempos de 30 y 40 minutos, ya que para el primer tiempo se observa un grado de esterificación del 70.67 % y para los tiempos de 30 y 40 minutos es de 76.39 % y 78.66 % respectivamente. Así, para el GE obtenido a partir del tratamiento convencional asistido por USAI los valores presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los primeros dos tiempos (10 y 30 minutos) en comparación

del tiempo de 40 minutos, ya que estos son de 80.50 % y 81.67 % para los tiempos de 10 y 30 minutos respectivamente, para el tiempo de 40 minutos el valor de GE es de 83.98 %. Asimismo, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos para cada los mismos tiempos de extracción (10, 30 y 40 minutos), el GE para 10 minutos de extracción a partir de HAUS presenta un aumento del 12.3 % en comparación con el tratamiento convencional, para los tiempos de 30 y 40 minutos la HAUS presentan un aumento promedio de 6.42 %, es decir, que el tratamiento de HAUS obtiene valores mayores de GE que el tratamiento por HA a partir de tiempos > 30 minutos. Es así, como los valores obtenidos en el presente estudio a partir de la extracción convencional con tiempos de extracción de 30 y 40 minutos se encuentran por encima de los reportados por Camacho *et al.* (2010) los cuales son de 77.1 % en muestras de guayaba Regional Roja, asimismo que los reportados por Ahmad & Rongen (2014) (53.4 %) en muestras de cáscara de guayaba.

Por lo tanto, las pectinas obtenidas en el presente estudio, relacionando su grado de esterificación (%) con su contenido de metoxilo (%), demuestran que dichos compuestos presentan un alto grado de esterificación y un bajo contenido de metoxilo (no cumplen con las especificaciones mínimas del contenido de metoxilo (Chasquibol, 2010; USP, 1990) para ambos tratamientos (HA e HAUS), esto se debe a la posible presencia de otros grupos funcionales (posiblemente etoxilos) además de los que componen estructuralmente a las pectinas, los cuales al unirse con los grupos carboxilos libres unidos al ácido galacturónico llegan a formar complejos que permiten que se genere una alta esterificación entre estos. Otro caso podría ser que el grupo ácido que compone dichos polisacáridos estén reaccionando de forma diferente a la normal durante la HA provocando la posible formación de grupos amidas.

3.3. Identificación de pectinas por Espectrofotometría (FT-IR)

3.3.1. Espectrofotometría IR de pectinas obtenidas a partir de HA e HAUS

Los resultados obtenidos a partir de la identificación de grupos funcionales en pectina obtenida a partir de diferentes tiempos de extracción (10, 30 y 40 minutos) mediante HA e HAUS a partir de espectrofotometría FT-IR se pueden observar en la Figura 3.6.

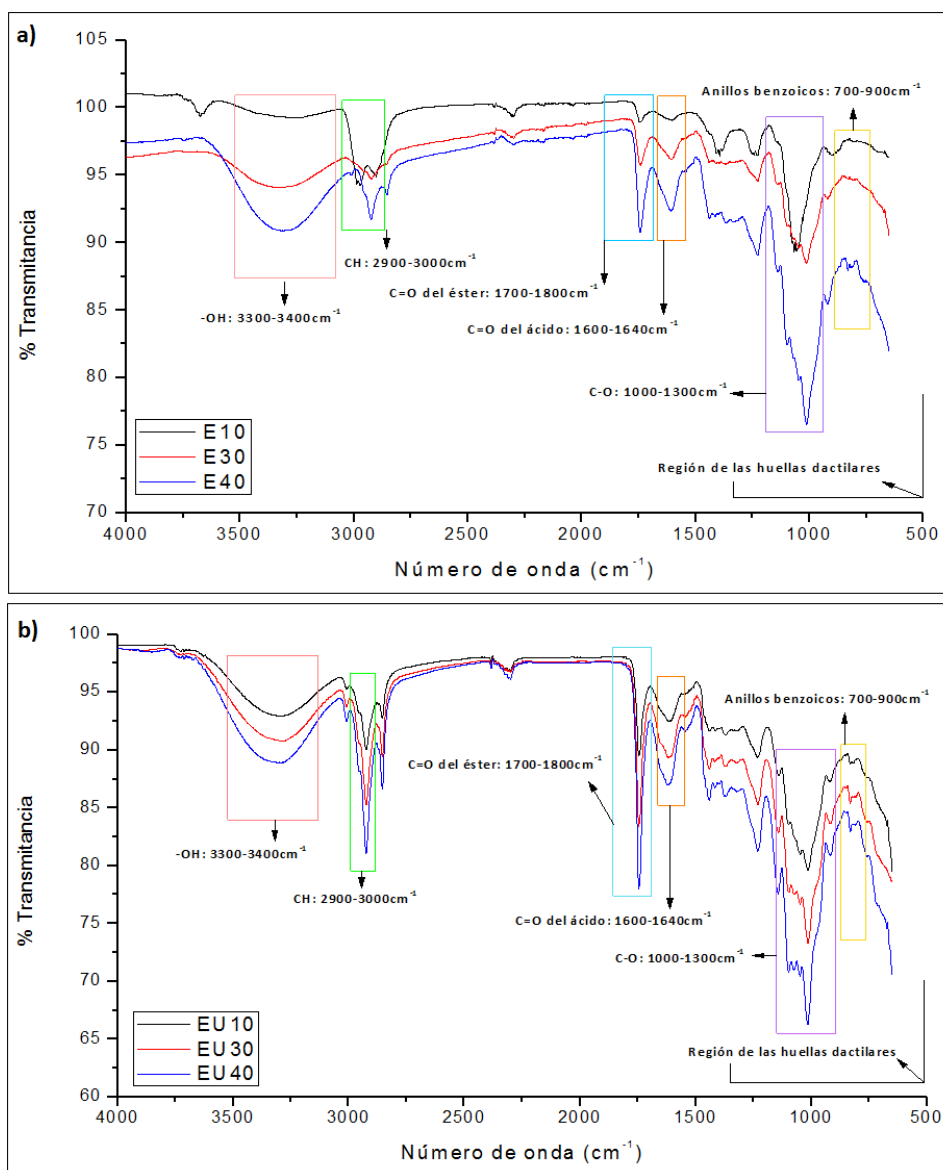


Figura 3.6. Comparación entre espectros IR de pectinas obtenidas en diferentes tiempos de extracción: a) HA, b) HAUS.

Se observa que para los espectros IR a partir de pectina obtenida a tiempos de extracción de 10, 30 y 40 minutos por HA, la primera banda posee valores de 3265.87 cm⁻¹, 3335.53 cm⁻¹ y 3308.67 cm⁻¹ respectivamente, las cuales se identifican por ser la más anchas debido a las vibraciones de tensión del O-H que se encuentran en un número de onda entre los 3300 a 3400 cm. La segunda banda con valores de 2972.08 cm⁻¹, 2920.63 cm⁻¹ y 2924.53 cm⁻¹ para los tiempos de 10, 30 y 40 minutos respecti-

vamente corresponde a los valores a la banda correspondiente al grupo C-H (2900 a 3000 cm^{-1}). Para la tensión del C=O del grupo éster presenta un número de onda de 1700 a 1800 cm^{-1} , los valores obtenidos para este apartado para los respectivos tiempos (10, 30 y 40 minutos) fueron de 1742.29 cm^{-1} , 1742.28 cm^{-1} y 1742.86 cm^{-1} respectivamente. Para el grupo C=O del ácido galacturónico los valores corresponden a un rango entre 1600 a 1640 cm^{-1} , los resultados obtenidos por el espectro para los tres tiempos son 1603.52 cm^{-1} , 1601.54 cm^{-1} y 1606.70 cm^{-1} respectivamente. A un número de onda 1000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} encontramos las vibraciones correspondientes a los enlaces C-O-C los cuales son característicos de la abundancia de los grupos metoxilo así como del grado de esterificación, para los tiempos de 10, 30 y 40 minutos los valores fueron de 1066.24 cm^{-1} , 1013.81 cm^{-1} y 1011.47 cm^{-1} respectivamente.

Los espectros IR a partir de pectina obtenida en tiempos de extracción de 10, 30 y 40 minutos para HAUS muestra valores de 3283.16 cm^{-1} , 3285.60 cm^{-1} y 3292.19 cm^{-1} respectivamente, dichos valores pertenecen a las bandas más intensas encontradas las cuales corresponden al grupo O-H (3300 a 3400 cm^{-1}). Para el grupo C-H (2900 a 3000 cm^{-1}) los valores obtenidos en los tiempos mencionados fueron de 2923.83 cm^{-1} , 2923.65 cm^{-1} y 2924.01 cm^{-1} , es así como se cumplen los valores para este grupo. Para el grupo C=O propios del éster el rango de número de onda va de 1700 a 1800 cm^{-1} , los valores obtenidos para este apartado fueron de 1743.87 cm^{-1} , 1744.02 cm^{-1} y 1743.93 cm^{-1} a los tiempos de 10, 30 y 40 minutos de extracción respectivamente. En el caso del enlace C=O del AGA las bandas características son de un rango que va de los 1600 cm^{-1} a 1640 cm^{-1} , los valores arrojados por el espectro IR para los tres tiempos son 1616.25 cm^{-1} , 1615.96 cm^{-1} y 1616.52 cm^{-1} respectivamente. Con valores de número de onda de 1000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} podemos encontrar a los enlaces C-O-C característicos a los grupos metoxilo así como a los del grado de esterificación, los valores obtenidos para los tiempos de 10, 30 y 40 minutos fueron de 1014.13 cm^{-1} , 1013.21 cm^{-1} y 1014.79 cm^{-1} respectivamente. Por otro lado, se puede observar que en ambos tratamientos, existe una transmitancia diferente para cada tiempo de extracción (10, 30 y 40 minutos), esto se debe a la cantidad de solutos propios en la muestra, ya que a menor transmitancia menor es la cantidad de luz que pasa a través del haz en el equipo, por lo que, conforme pasa el tiempo de extracción mayor es la cantidad de grupos funcionales propios de la pectina.

En la Figura 3.7, se observan los espectros IR de pectinas obtenidas a partir de HA e HAUS con el fin de hacer la comparación entre ambos tratamientos al tiempo

de 40 minutos, ya que para este tiempo ambos tratamientos mostraron una transmitancia menor, asimismo, se puede observar que para las vibraciones de tensión del grupo O-H las bandas proporcionadas por el IR son las más anchas en comparación a las bandas correspondientes a los demás grupos funcionales característicos de las pectinas.

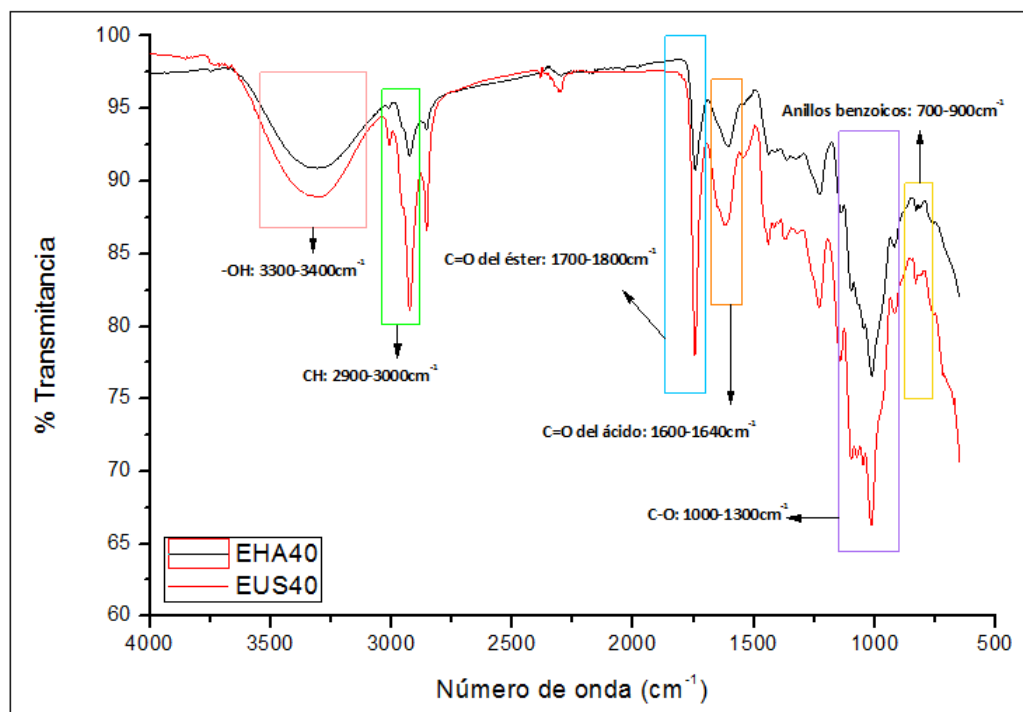


Figura 3.7. Espectro infrarrojo de pectinas obtenidas a partir de guayaba por HA e HAUS en $t=40$ min.

Asimismo, se observa que el tratamiento de HAUS obtuvo una transmitancia menor que la obtenida por HA, esto se debe a que los ultrasonidos en conjunto con altas temperaturas provocan un proceso de despolimerización (Delgado, 2015) el cual ocasiona la ruptura de enlaces entre las estructuras químicas de la pectina dando origen a un aumento en la cantidad de grupos funcionales presentes en la misma. Los espectros IR obtenidos a partir de pectinas obtenidas por ambos tratamientos se pueden encontrar en el apartado de Anexos adjuntos al presente trabajo. Por lo tanto la Espectrofotometría IR permitió la identificación de los grupos funcionales presentes en la pectina obtenida mediante HAUS, con lo que se corroboró que la misma no mostró modificaciones estructurales. Además, se pudo observar la

influencia del tiempo de extracción a partir de la transmitancia en ambas técnicas.

CONCLUSIONES

Se puede concluir a partir de los resultados obtenidos y su discusión lo siguiente:

- Para la cuantificación de pectina total encontrada en muestras de guayaba, es mayor cuando la muestra se somete a un proceso de escaldado y posteriormente es secada.
- Es posible obtener un rendimiento mayor de pectina en muestras de guayaba a partir de hidrólisis ácida asistida con ultrasonidos de alta intensidad con tiempos de extracción mayores a 30 minutos que el obtenido por un tratamiento convencional.
- Para la caracterización e identificación de la pectina se tiene que:
 - El peso equivalente resulta mayor cuando se somete a tiempos de extracción mayores a 30 minutos para ambos tratamientos, asimismo resulta mayor cuando se somete a un tratamiento de extracción asistido por USAI, por el efecto despolimerizador que este causa en el biopolímero.
 - El contenido de metoxilo aumenta con el tiempo de extracción para el tratamiento de HA asistido con USAI, y se demuestra que los productos fuera de norma (guayaba) poseen porcentajes de pectina de bajo metoxilo la cual resulta útil para la industria farmacéutica.
 - Existe un aumento del porcentaje de AAG en pectinas obtenidas a partir del tratamiento convencional asistido con USAI, asimismo se observa un bajo contenido de AAG para ambos tratamientos el cual demuestra la baja pureza que las pectinas obtenidas poseen, esto se debe a que para el presente estudio se pretendía disminuir el uso de solventes (etanol) el cual es utilizado para realizar un amplio número de lavados a dichos compuestos para purificarla.

- Aunque las pectinas obtenidas presentan un alto grado de esterificación (70.67 % a 83.98 %) podrían considerarse como pectinas de alto metoxilo, sin embargo, el contenido de metoxilo obtenido resulta con porcentajes bajos y este valor es el que realmente determina el contenido de grupos carboxilos esterificados, es decir, clasifica a que grupo pertenece las pectinas (alto o bajo metoxilo).
- El análisis espectrofotométrico IR confirma que los compuestos funcionales obtenidos presentan las bandas correspondientes que caracterizan a los grupos funcionales propios de las mismas.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se recomienda lo siguiente:

- Se recomienda evaluar en futuros estudios más variables de extracción como lo son, temperaturas, tiempos de extracción, potencias en ultrasonidos, así como pH's del medio. Evaluar el contenido de pectina en diversas muestras con referencia a los desechos orgánicos de las mismas (cáscaras) o en su caso similar a productos fuera de norma para seguir trabajando con el impacto ambiental que las mismas provocan.
- Considerar métodos de recuperación del solvente utilizado (etanol) para llevar a cabo los precipitados de pectina, con el fin de disminuir su uso.
- Evaluar varios tratamientos de conservación de la materia prima como lo son las temperaturas y tiempos de escaldado así como de secado de la muestra para obtener una mayor cantidad de pectinas así como su calidad.
- Evaluar la obtención de pectinas por métodos convencionales que no involucren el calentamiento (Hidrólisis Ácida) y hacer la comparación del mismo con las tecnologías nuevas que este trabajo propone como son los ultrasonidos de alta intensidad.
- Para el caso de la espectrofotometría IR, se recomienda en futuros trabajos llevar a cabo la cuantificación de pectina a partir de una pectina estandarizada.

ANEXOS

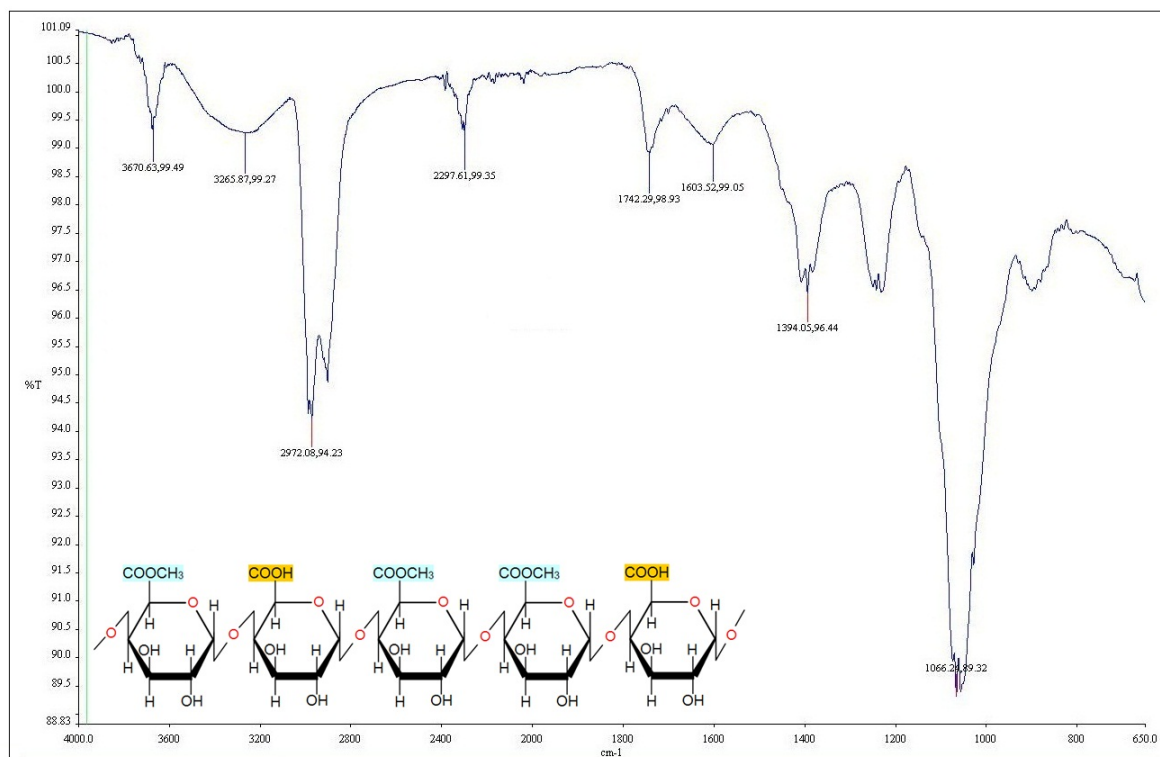


Figura 3.8. Espectro IR de pectina obtenida por HA en un tiempo de extracción de 10 min

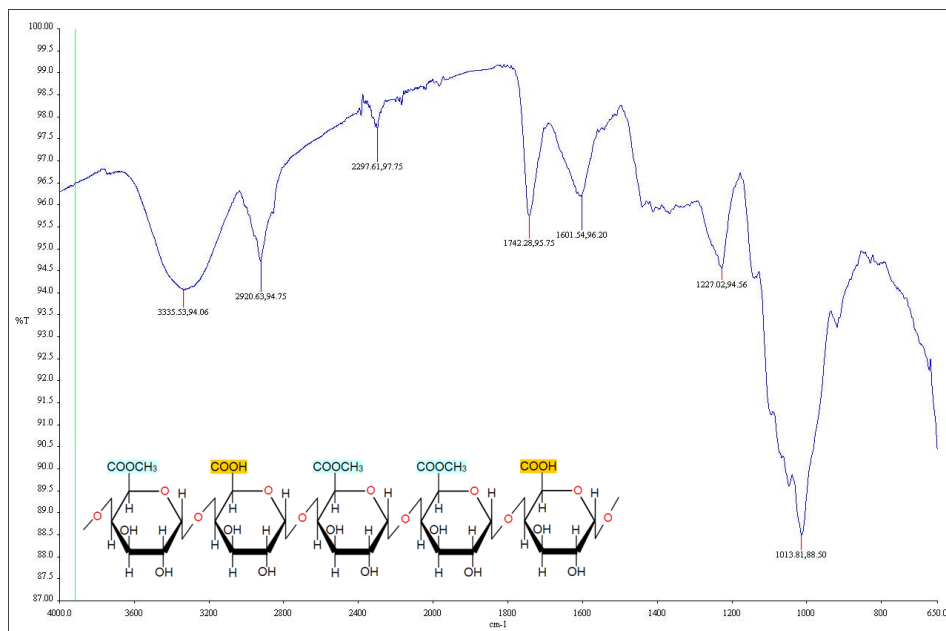


Figura 3.9. Espectro IR de pectina obtenida por HA en un tiempo de extracción de 30 min

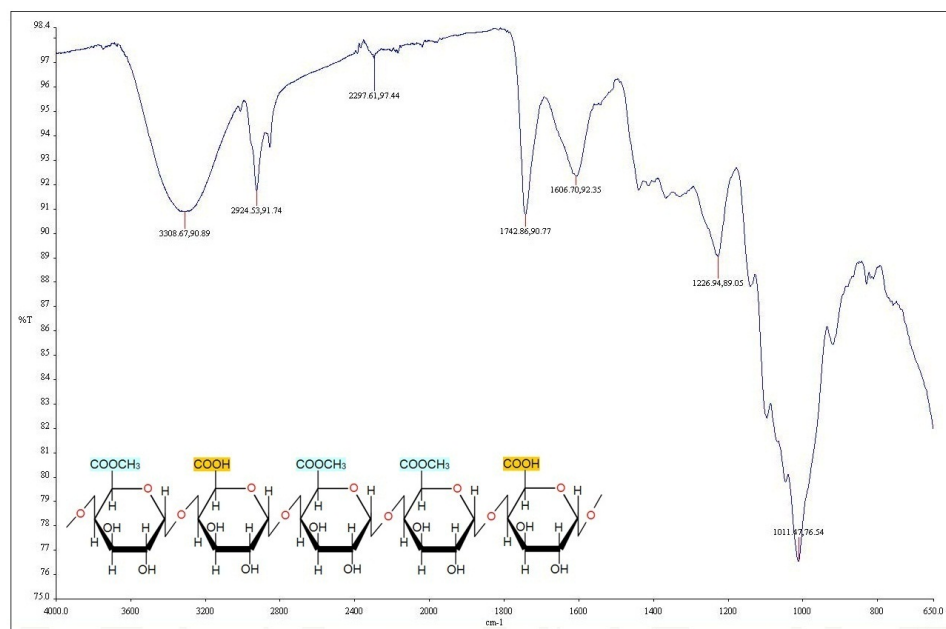


Figura 3.10. Espectro IR de pectina obtenida por HA en un tiempo de extracción de 40 min.

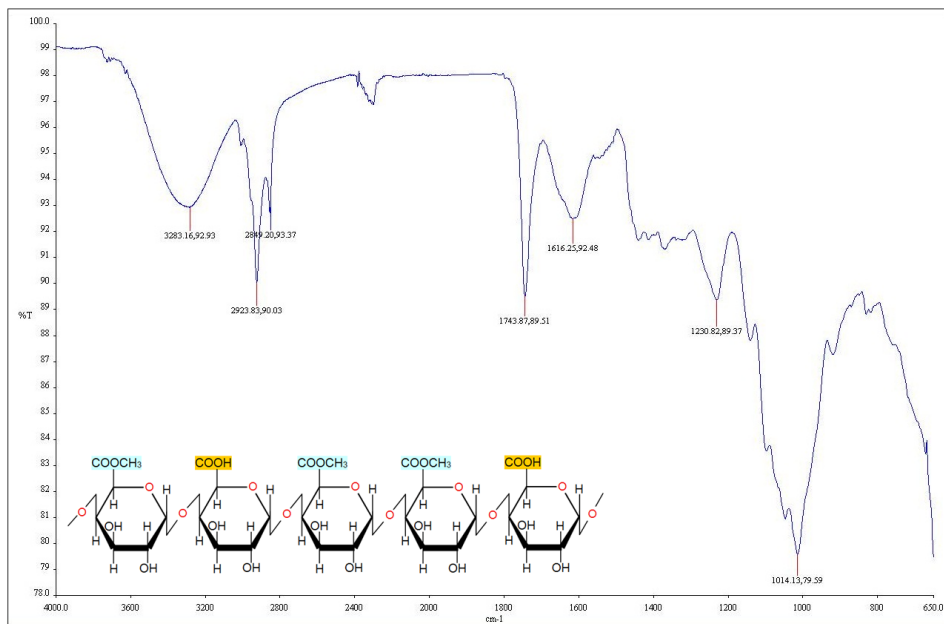


Figura 3.11. Espectro IR de pectina obtenida por HAUS en un tiempo de extracción de 10 min.

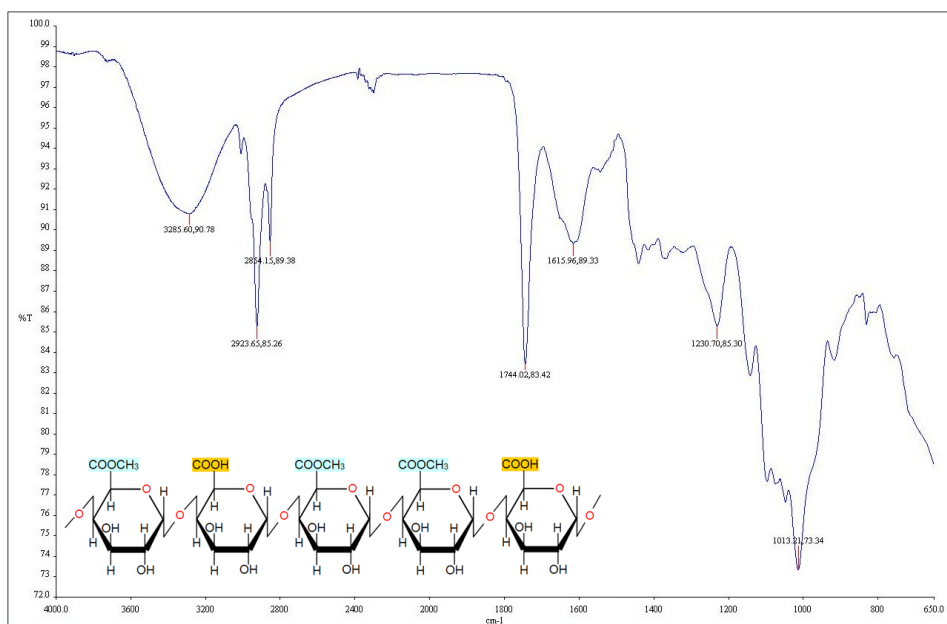


Figura 3.12. Espectro IR de pectina obtenida por HAUS en un tiempo de extracción de 30 min.

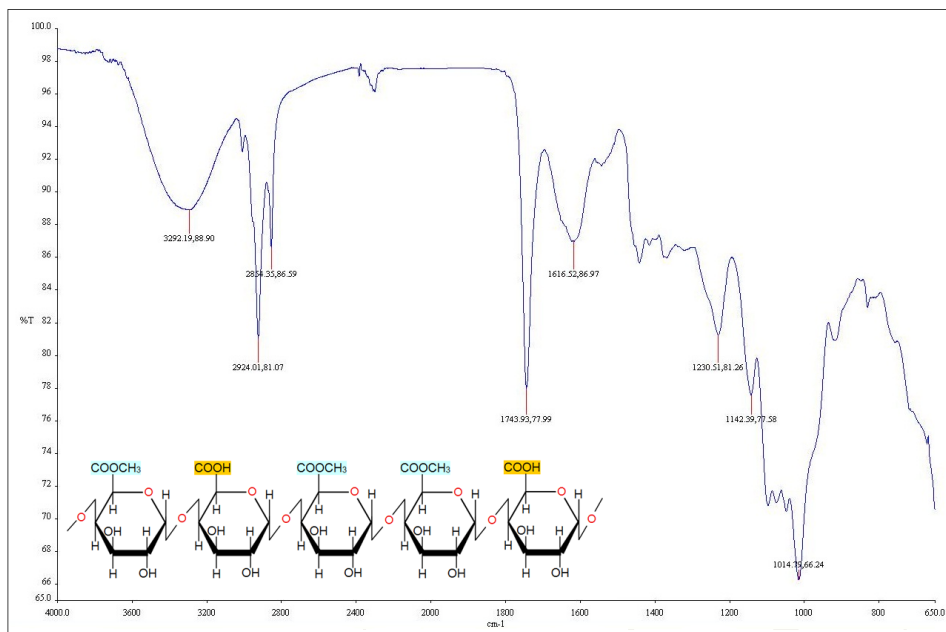


Figura 3.13. Espectro IR de pectina obtenida por HAUS en un tiempo de extracción de 40 min.

Bibliografía

- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M., Hu, B., Lei, S., & Zeng, X. 2014. Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics sonochemistry*, **21**(1), 93–97.
- Ahmad, S., & Rongen, H. 2014. Extraction And Characterization of Pectin From Guava Fruit Peel. *International Journal of Research in Engineering & Advanced Technology*.
- Aldana-Villaruel, D., Aguilar-Gonzales, C., Contreras-Esquivel, J., & Nevárez-Moorriñon, G. 2011. *Moléculas pécticas: extracción y su potencial aplicación como empaque*.
- Allinger, N. 1978. *Química orgánica*. Vol. 1. Reverté.
- AOAC. 2000. Acidity titratable of fruit products (AOAC Official Method 942.15). *Official methods of analysis of AOAC International*.
- Awad, T., Moharram, H., Shaltout, O., Asker, D., & Youssef, M. 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, **48**(2), 410–427.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., & Omar, A. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, **117**(4), 426–436.
- Barazarte, Humberto, García, Tonny, Garrido, Elba, Pérez, Hilda, & Terán, Yanira. 2010. Evaluación de dos métodos colorimétricos para cuantificar sustancias pécticas en parchita (*passiflora edulis*). *Bioagro*, **22**(2), 163–166.
- Biesalski, H., Dragsted, L., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., & Weber, P. 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, **25**(11), 1202–1205.
- Camacho, M., Espinal, M., García J. Jiménez L., Silva, K., & Restrepo, P. 2010. Desarrollo de productos enriquecidos con fibra de guayaba. *Desarrollo de productos*

- funcionales promisorios a partir de la guayaba (Psidium guajava L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva*, 157–174.
- Carranza-Concha, J. 2010. *Influencia del procesado en el valor nutritivo y funcional de la uva blanca*. Ph.D. thesis.
- Chacín, J., & Marín, M. 2010. Evaluación del contenido de pectina en diferentes genotipos de guayaba de la zona sur del Lago de Maracaibo. *Multiciencias*, **10**(1).
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. 2013. Use of power ultrasound to improve extraction and modify phase transitions in food processing. *Food Reviews International*, **29**(1), 67–91.
- Chasquibol, N. 2010. Aplicación de la espectroscopía ft-ir en la identificación de polisacáridos obtenidos de los frutos del níspero de la sierra y de la granadilla. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, **13**(2), 12–21.
- Chemat, F., & Khan, M. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, **18**(4), 813–835.
- Coma, V. 2013. Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. *Polímeros*, **23**(3), 287–297.
- Commission, Joint FAO/WHO Codex Alimentarius, Programme, Joint FAO/WHO Food Standards, & Organization, World Health. 2007. *Codex Alimentarius: Fresh Fruits and Vegetables*. Food & Agriculture Org.
- Cárcel, J., Benedito, J., Rosselló, C., & Mulet, A. 2007. Influence of ultrasound intensity on mass transfer in apple immersed in a sucrose solution. *Journal of food engineering*, **78**(2), 472–479.
- Cristina, A. 2012. Extracción de Pectina de Alto Metoxilo a Partir de Cáscara de Parchita para la Producción de Mermelada. *Universidad de los Andes Facultad de Ingeniería Escuela de Ingeniería Química, Mérida Edo Mérida*.
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics sonochemistry*, **20**(4), 1076–1080.
- Delgado, J. 2015. Aplicación del Ultrasonido en la Industria de los Alimentos. *Publicaciones e Investigación*, **6**, 141–152.
- Denny, A., & Buttriss, J. 2007. Plant foods and health: focus on plant bioactives. *Synthesis report*, 1–64.
- Dubie, J., Stancik, A., Morra, M., & Nindo, C. 2013. Antioxidant Extraction from

- Mustard (*Brassica juncea*) Seed Meal Using High-Intensity Ultrasound. *Journal of food science*, **78**(4), E542–E548.
- Esquivel, A., & Aguilar, P. 2007. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha*, **20**(4), 7.
- Faostat, FAO. 2009. Statistical Databases. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Fishman, M., & Cooke, P. 2009. The structure of high-methoxyl sugar acid gels of citrus pectin as determined by AFM. *Carbohydrate research*, **344**(14), 1792–1797.
- García, Ginés Navarro, & García, Simón Navarro. 1985. *Sustancias pécticas: química y aplicaciones*. EDITUM.
- Gaur, R., Sharma, A., Khare, S., & Gupta, M. 2007. A novel process for extraction of edible oils: enzyme assisted three phase partitioning (EATPP). *Bioresource technology*, **98**(3), 696–699.
- Ghafoor, K., Choi, Y., Jeon, J., & Jo, I. 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(11), 4988–4994.
- Gil-Hernández, A., & López-Ruiz, M. 2009. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. *Madrid: Médica Panamericana*.
- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. 2013. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics sonochemistry*, **20**(5), 1316–1323.
- González-Sánchez, G., Padilla, R., Esquivel, V., Robles, E., & Perales, C. 2000. Tecnología para producir guayaba en Calvillo, Aguascalientes. *CIRNE–Campo Experimental Pabellón. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Pabellón. (Folleto para productores Núm. 28)*.
- González-Sánchez, P., Padilla, R., Reyes, M., Perales de la C, A., & Esquivel, V. 2002. Guayaba su cultivo en México. *CIRNE–Campo Experimental Pabellón. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Pabellón, Aguascalientes. (Libro Técnico Núm. 1)*.
- Gutiérrez, E., Medina, G., Roman, M., Florez, O., & Martínez, O. 2009. Obtención y cuantificación de fibra dietaria a partir de residuos de algunas frutas comunes en Colombia. *Vitae*, **9**(1).

- Guzmán, R., & Suárez, A. and Castro, C. 1975. Determinación del contenido de Pectina en el Mango y su aplicación en la elaboración de mermelada. *Boletín informativo, DEA. Colombia: Universidad Nacional de Bogotá*, 25–37.
- Herrero, A., & de Avila, M. 2006. Innovaciones en el proceso de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de medicina*, **50**(4), 71–74.
- Hwang, J., Roshdy, T., Kontominas, M., & Kokini, J. 1992. Comparison of dialysis and metal precipitation effects on apple pectins. *Journal of food science*, **57**(5), 1180–1184.
- Kaufmann, B., & Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis*, **13**(2), 105–113.
- Kintner, P., & VanBuren, J. 1982. Carbohydrate Interference and Its Correction in Pectin Analysis Using the m-Hydroxydiphenyl Method. *Journal of Food Science*, **47**(3), 756–759.
- Lattimer, James M, & Haub, Mark D. 2010. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, **2**(12), 1266–1289.
- Li, J., Guo, S., & Li, X. 2005. Degradation kinetics of polystyrene and EPDM melts under ultrasonic irradiation. *Polymer degradation and stability*, **89**(1), 6–14.
- Ll, R., Jennifer, P., Perea, A., & Stashenko, E. 2009. Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. *Vitae*, **16**(1), 110–115.
- Maldonado-Culquimboz, Y., Salazar, S., & Millones, C. 2010. Extracción de pectina mediante el método de hidrólisis ácida en frutos de maushan (*Vasconcellea weberbaueri* (Harms) VM Badillo) provenientes del distrito de San Miguel de Soloco, región Amazonas. *Aporte Santiaguino*, **3**(2), 177–184.
- Marquina, V., Araujo, L, Ruíz, J, Rodríguez-Malaver, A, & Vit, P. 2008. Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Archivos latinoamericanos de nutrición*, **58**(1), 98–102.
- Mason, T. 1998. Power ultrasound in food processing. The way forward. *Ultrasound in food processing*, **105**.
- McClements, D., & Gunasekaran, S. 1997. Ultrasonic characterization of foods and drinks: principles, methods, and applications. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **37**(1), 1–46.
- Medina, M., & Pagano, F. 2003. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo Criolla Roja. *Revista de la Facultad de Agronomía*, **20**(1).

- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M., Meza-Velázquez, J., Simal, S., & Rosselló, C. 2014. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: a response surface methodology approach. *Carbohydrate polymers*, **106**, 179–189.
- Méndez, R. 1995. Aprovechamiento de subproductos agropecuarios. *Unisur, Santafé de Bogotá*, **336**.
- Mollea, C., Chiampo, F., & Conti, R. 2008. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry*, **107**(3), 1353–1356.
- Morales, J. 2015. *Residuos agroalimentarios I.3*. De residuo a recurso: Recursos orgánicos. Mundi-Prensa.
- Ortuño, Á. 1999. *Introducción a la química industrial*. Reverté.
- Owens, H. 1952. Methods used at Western Regional Research Laboratory for extraction and analysis of pectic materials.
- Owens, H., Lotzkar, H., Merrill, R., & Peterson, M. 1944. Viscosities of pectin solutions. *Journal of the American Chemical Society*, **66**(7), 1178–1182.
- Owens, H., Miers, J., C., & Maclay, W. 1948. Distribution of molecular weights of pectin propionates. *Journal of colloid science*, **3**(4), 277–291.
- Pak, N. 2000. La fibra dietética en la alimentación humana, importancia en la salud. *In: Anales de la Universidad de Chile*.
- Palma, M., & Barroso, C. 2002. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, **458**(1), 119–130.
- Páez, G., Marín, M., Mármol, Z., & Ferrer, J. 2005. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DeGENER). *Revista de la Facultad de Agronomía*, **22**(3).
- Pilli, S., Bhunia, P., Yan, S., LeBlanc, R., Tyagi, R., & Surampalli, R. 2011. Ultrasonic pretreatment of sludge: a review. *Ultrasonics sonochemistry*, **18**(1), 1–18.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A., & Chemat, F. 2013. Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. *Food Control*, **31**(2), 593–606.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, **30**(1), 37–44.
- Raj, B., Rajendran, V., & Palanichamy, P. 2004. *Science and technology of ultrasonics*. Alpha Science Int'l Ltd.
- Ranganna, S. 1986. *Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable pro-*

- ducts*. Tata McGraw-Hill Education.
- Rastogi, N. 2011. Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, **51**(8), 705–722.
- Restrepo-Gallego, M. 2012. Producción más limpia en la industria alimentaria.
- Roberfroid, M. 1999. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *The Journal of nutrition*, **129**(7), 1398S–1401s.
- Rodríguez, R., Jimenez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., & Heredia, A. 2006. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in food science & technology*, **17**(1), 3–15.
- Rosas-Mendoza, M., & Fernández-Muñoz, J. 2012. FTIR aplicada durante la deshidratación osmótica de mango Ataulfo (*Magnífera indica* L.). *Superficies y vacío*, **25**(1), 8–13.
- Roseiro, L., Duarte, L., Oliveira, D., Roque, R., Bernardo-Gil, M., Martins, A., Sepúlveda, C., Almeida, J., Meireles, M., Gírio, F., & Rauter, A. 2013. Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, **47**, 132–138.
- Rostagno, Mauricio A, Palma, Miguel, & Barroso, Carmelo G. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, **1012**(2), 119–128.
- SAGARPA. 2015. *Servicio de información agroalimentaria y pesquera*.
- Saval, S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, AC*, 14–46.
- SE. 2002. *NMX-FF-040-SCFI-2002, PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - FRUTA FRESCA - GUAYABA (Psidium guajava L.)*. Diario Oficial de la Federación.
- Silva, N., Benites, E., & Gomero, J. 2008. Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial*, 175–199.
- Sivakumar, M., & Pandit, A. 2001. Ultrasound enhanced degradation of Rhodamine B: optimization with power density. *Ultrasonics Sonochemistry*, **8**(3), 233–240.
- Skoog, D., West, D., M., & Holler, F. 1997. *Fundamentos de química analítica*. Vol. 2. Reverté.
- Sánchez, R., Najul, M., Brito, E., & de Giner, G. 2009. El manejo de los residuos en

- la industria de agroalimentos en Venezuela. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, **34**(2), 91–99.
- Solarte, M., Melgarejo, M., Morales, L., Trujillo, A., Fernández, Solarte, J., Hernández, M., Trujillo, J., & Malgarejo, L. 2010. *Caracterización fisiológica y bioquímica del fruto de guayaba durante la maduración*. Tech. rept.
- Stückrath, R., Quevedo, R., de la Fuente, L., Hernández, A., & Sepúlveda, V. 2008. Effect of foliar application of calcium on the quality of blueberry fruits. *Journal of plant nutrition*, **31**(7), 1299–1312.
- Tang, W. 2003. *Physicochemical treatment of hazardous wastes*. CRC Press.
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz V., & Knorr, D. 2006. Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Reviews International*, **22**(4), 405–423.
- Torres, R., & Castro, M. 2009. Caracterización fisicoquímica y reológica de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) variedades Híbrido de Klom Sali, Puerto Rico, D14 y Red. *Vitae*, **16**(1), 13–18.
- Turquois, T., Rinaudo M. Taravel F., & Heyraud, A. 1999. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids*, **13**(3), 255–262.
- USDA. 1987. *Nutrient Analysis of Specialty Fruit Marketed in the United States*. Beltsville MD.
- USP. 1990. US Pharmacopeial convention. *Rockville, Md*, 1788–1789.
- Vajnhandl, S., & Le Marechal, A. 2005. Ultrasound in textile dyeing and the decolouration/mineralization of textile dyes. *Dyes and Pigments*, **65**(2), 89–101.
- Vinatoru, M., Toma M. Radu O. Filip P. Lazurca D., & Mason, T. 1997. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, **4**(2), 135–139.
- Viniegra, V., Sierra O., & Jáuregui, J. 2001. Gestión y tratamiento de residuos sólidos orgánicos de la industria de transformados vegetales. *Encuentro Internacional de Gestión de Residuos Orgánicos en el Ambito Rural Mediterráneo*.
- Wang, W., Ma X., Xu, Y., Cao Y. Jiang Z. Ding T. Ye X., & Liu, D. 2015. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food chemistry*, **178**, 106–114.
- Wang, X., Chen, Q., & Lü, X. 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, **38**, 129–137.

- Woo, K., Chong, Y., Hiong, S., Li, & Tang, P. 2010. Pectin Extraction and Characterization from Red Dragon. *Journal of Biological Sciences*, **10**(7), 631–636.
- Yepes, S., Montoya, L., & Orozco, F. 2008. Agroindustrial waste valorization-fruits-in Medellin and the south of Valle de Aburra, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, **61**(1), 4422–4431.