

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos
pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial
aplicación como aditivos alimentarios

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS
PRESENTA:

Felipa Reséndiz Vega

Dirección: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, ICAP, UAEH.
Codirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández, ICAP, UAEH.

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Julio 2010

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Físico-Química y Laboratorio de Análisis Especiales del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. La dirección de este trabajo estuvo a cargo de la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández y del Dr. Norberto Chavarría Hernández. El trabajo forma parte de las actividades de los proyectos: “EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES GELIFICANTES DE POLISACÁRIDOS PÉCTICOS DE TUNA (*Opuntia albicarpa* S.) DE POTENCIAL APLICACIÓN COMO ADITIVOS ALIMENTARIOS”. CONACyT 2008 Apoyo para Investigadores Nacionales para Fortalecer Actividades de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Licenciatura, y “CONSOLIDACIÓN DEL CUERPO ACADÉMICO DE BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA”, PIFI 2008-PROMEP.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por ser la institución que me guió durante mi formación profesional, al Instituto de Ciencias Agropecuarias porque dentro de sus aulas se me impartieron los conocimientos que permitieron pudiera culminar con mi carrera, al Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos UAEH-ICAp en donde realicé los experimentos del trabajo de investigación.

Agradezco a CONACyT por el apoyo al presente trabajo de investigación, a la CONSOLIDACIÓN DEL CUERPO ACADÉMICO DE BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA”, PIFI 2008-PROMEP por la beca otorgada a mi persona.

A mis directores de tesis, mi más profundo agradecimiento por su confianza, paciencia, amistad y por compartir sus conocimientos; ya que me contagiaron el entusiasmo por la investigación.

A Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández por haberme elegido para formar parte de este proyecto de investigación, ya que gracias a sus confianza y a su enorme paciencia pude generarme un panorama de la Reología.

Al Dr. Norberto Chavarría por su apoyo y comprensión, porque me satisface de sobremanera haber pertenecido al Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria.

A la Dra. Ma. Guadalupe Sosa Herrera y Dra. Laura Patricia Martínez Padilla del Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos de la FES-Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo recibido durante mi estancia.

A Miguel, Sixto, Jorge Terrazas, Edgar y Azucena por su apoyo y tiempo durante los experimentos realizados.

Agradezco a los profesores del Área Académica de Ingeniería Agroindustrial, a mis compañeros de la carrera, a los integrantes del CABA por haberme permitido compartir con ustedes grandes experiencias.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a dios por haberme dado la fortaleza necesaria para salir adelante.

A mis padres Fidel Reséndiz Rojo y María Elena Vega Francisco por haberme dado la vida, todo lo que soy es gracias a ustedes porque son el motor de mi vida, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos por estar conmigo en todo momento: Anabel, Antonia, Gerardo, Yesica, Kenia. Y a mi sobrino Ángel por ser precisamente eso en nuestra familia "un ángel".

A Miguel por ser mi compañero y el gran amor de mi vida; a la familia Morales-Huerta por haberme brindado la oportunidad de conocerlos.

A mis tíos y padrinos Ide y Carlos, muchas gracias por el apoyo que me brindaron.

A mis tíos y tías: Silverio, Ide, Margarita, Juana, Lety, Yola, Juan, Ramiro, Mencho, Jesús, Irene, Esteban, Carlos, no quisiera olvidar a nadie porque todos tienen un lugar en mi corazón.

A mis abuelitos Juan, Esperanza y Juan q.e.p.d., en mi mente y corazón viven eternamente.

A mis primos: Carlos Alberto, Cintia, Alejandro, Luis Enrique, Yaquelin, Esmeralda, María de Jesús, Cristian por estar siempre conmigo y por enseñarme cosas cada día

ÍNDICE GENERAL

	Página
Capítulo 1 Marco teórico	1
1.1 Reología.	2
1.1.1 Fundamentos de Reología.	2
a) Funciones materiales.	2
b) Esfuerzo y deformación.	3
c) Viscoelasticidad.	3
d) Número de Deborah.	5
1.1.2 Pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud	5
1.1.2.1 Tipos de pruebas oscilatorias en régimen lineal	8
a) Barrido de deformación (o barrido de esfuerzo)	8
b) Barrido de frecuencia	9
c) Barrido de temperatura	10
d) Barrido de tiempo	11
1.2 Geles	12
1.2.1 Clasificación de los geles	13
1.3 Pectinas	14
1.3.1 Composición química de las pectinas	18
1.3.2 Fuentes de pectinas	19
1.3.3 Clasificación comercial de las pectinas	20
1.3.4 Mercado de la pectina	22
1.3.5 Mecanismo de gelificación de las pectinas	23
a) Pectinas de alto metoxilo	23
b) Pectinas de bajo metoxilo	24
1.3.6 Propiedades emulsificantes de pectinas	25
1.3.7 Propiedades reológicas de pectinas de bajo metoxilo	26
1.3.8 Polisacáridos pécticos de tuna	31
Capítulo 2 Justificación, Hipótesis y objetivos	33
2.1 Justificación	34
2.2 Hipótesis	35
2.3 Objetivos	35
2.3.1 Objetivo general	35
2.3.2 Objetivos particulares	36
Capítulo 3 Materiales y Métodos	37
3.1 Materiales	38
3.2 Métodos	38
3.2.1 Extracción de pectina	38
3.2.2 Purificación de la pectina extraída	40
3.2.3 Determinación del rendimiento de pectina extraída	41
3.2.4 Caracterización fisicoquímica	41
a) Determinación de humedad	41
b) Determinación de cenizas	42
c) Determinación de proteína	42
3.2.5 Determinación de la distribución de masas moleculares	43
3.2.6 Determinación de azúcares totales	44

a) Hidrólisis ácida de pectina	44
b) Determinación de azúcares totales	44
3.2.8 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	45
3.2.9 Preparación de soluciones y geles de pectina	46
3.2.10 Determinaciones reológicas	47
Capítulo 4 Resultados y Discusión	49
4.1 Análisis proximal	50
4.2 Distribución de masas moleculares de la pectina obtenida de cáscara de tuna	54
4.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	55
a) Comparación de estructura y grupos funcionales de la pectina obtenida a partir de cáscara de tuna y ácido poligalacturónico	55
b) Estimación del grado de metoxilación de la pectina extraída de cáscara de tuna	60
4.4 Pruebas reológicas	61
4.4.1 Pruebas preliminares	61
a) Evolución de los módulos dinámicos con la temperatura	61
b) Evolución de los módulos dinámicos con el tiempo	62
c) Evolución de los módulos dinámicos con la frecuencia	63
4.4.2 Estudios reológicos usando bajas relaciones estequiométricas calcio/pectina	66
a) Evolución de los módulos dinámicos con la temperatura	66
b) Evolución de los módulos dinámicos con el tiempo	68
c) Evolución de los módulos dinámicos con la frecuencia	69
Capítulo 5 Conclusiones y Recomendaciones para trabajos futuros	74
5.1 Conclusiones	75
5.2 Recomendaciones para trabajos futuros	76
Capítulo 6 Referencias Bibliográficas	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Fuentes a partir de las cuales se han aislado polisacáridos pécticos (Ovodov, 2009).	20
Cuadro 2	Condiciones cromatográficas para la determinación de distribución de masas moleculares en pectina extraída de la cáscara de tuna.	44
Cuadro 3	Matriz de experimentos para examinar el efecto de la concentración de calcio en las propiedades reológicas de soluciones de pectina al 0.4 % (p/p). R es la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$.	47
Cuadro 4	Valores de rendimiento obtenidos durante la extracción por lote de polisacáridos pécticos extraídos de la cáscara de tuna de distintas variedades.	50
Cuadro 5	Análisis proximal de la composición química de la pectina obtenida a partir de cáscara de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> L.). Se muestran los datos promedio (n=3) \pm su desviación estándar.	51
Cuadro 6	Contenido de azúcares neutros y ácido galacturónico en polisacáridos pécticos extraídos de cáscara de tuna. Datos expresados en % peso/peso en base seca.	53
Cuadro 7	Distribución de las masas moleculares en la pectina de cáscara de tuna mediante cromatografía de líquidos de tamiz molecular.	54
Cuadro 8	Valores de n de la relación $G' \propto \omega^n$ en los espectros mecánicos dinámicos de geles de pectina de tuna 0.4% p/p en presencia de distintas concentraciones de calcio. R (0-0.33).	64
Cuadro 9	Valores de n de la relación $G' \propto \omega^n$ en los espectros mecánicos dinámicos de geles de pectina de tuna 0.4% p/p en presencia de distintas concentraciones de calcio. R (0-0.33).	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática del comportamiento viscoelástico de sólidos perfectos de Hooke, líquidos viscosos de Newton y materiales viscoelásticos en pruebas reológicas oscilatorias (Gunasekaran y Ak 2003).	4
Figura 2	Representación esquemática del barrido de deformación a frecuencia constante (1 Hz), con un ejemplo del comportamiento de los valores de los módulos viscoelásticos y la representación de la zona de viscoelasticidad lineal (ZVL) (Modificado de Gunasekaran y Ak, 2003).	9
Figura 3	Barrido de frecuencia usando una amplitud de deformación constante, se muestra también (abajo) un ejemplo de la dependencia del módulo de almacenamiento con la frecuencia (Modificado de Gunasekaran y Ak, 2003).	10
Figura 4	Representación de una prueba oscilatoria usando rampa y un barrido de temperatura: Se muestra también un ejemplo de la evolución del módulo G' con la temperatura.	11
Figura 5	Representación de una prueba oscilatoria en donde se realiza un barrido de tiempo con valores de temperatura y frecuencia constantes. Ejemplo de este tipo de pruebas es la gelificación de la leche a 40 °C por efecto de glucono delta lactona (GDL) (Gunasekaran y Ak, 2003).	12
Figura 6	Distribución de la pectina en la pared celular (Taiz y Zeiger, 2006)	16
Figura 7	Esquema de los tres principales polisacáridos que componen la estructura de la pectina, homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) (CP Kelco, 2010).	19
Figura 8	Unidades de ácido galacturónico y su presentación en moléculas de pectina; de izquierda a derecha: molécula no esterificada, metil esterificada, amidada y acetilada (Brejnholt, 2010).	21
Figura 9	Desarrollo del mercado mundial de pectina desde 1982 al 2005 (Brejnholt, 2010).	22
Figura 10.	Aplicaciones de pectina, en panificación se incluyen productos como pan, pasteles; alimentos misceláneos incluye mayonesa, salsas, pastas con bajo contenido de calorías, preparaciones de cárnicos, postres; productos lácteos incluyen yogur y postres lácteos; confitería incluye gomitas y mermeladas. Bebidas de frutos incluyen jugos, bebidas carbonatadas, bebidas no lácteas, licores, bebidas lácteas neutras; preparaciones de frutas abarcan principalmente yogur con fruta, bebidas lácteas acidificadas incluye leche y bebidas de soya (CP Kelco, 2005, citado en Brejnholt, 2010).	23

Figura 11	Modelo de caja de huevo que representa el mecanismo de gelificación para pectinas de bajo grado de metoxilación (CP Kelco, 2005 citado por Brejnholt, 2010).	25
Figura 12	Evolución de los módulos dinámicos G' y G'' con la temperatura durante pruebas reológicas oscilatorias a frecuencia constante de 1 Hz, enfriando la muestra (3 °C/min) de pectina de girasol 0.5%, 30% azúcar, 25 mg $Ca^{2+}/g_{pectina}$, pH 2.7 (Iglesias y Lozano, 2004).	29
Figura 13	Variación de los módulos G' y G'' (ejes de la izquierda), y viscosidad compleja (eje derecha) en pruebas reológicas oscilatorias en geles de pectina de nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>) al 1.6 %, 5°C, deformación 0.05, adicionados con $CaCl_2$ a tres niveles de la relación estequiométrica $R=2[Ca^{2+}]/[COO^-]$, a)0.07, b) 0.21 y c) 0.42, los cuadrados representan G' , los círculos representan G'' , los triángulos representan η^* (Cárdenas <i>et al.</i> , 2008).	31
Figura 14.	Tuna blanca (<i>Opuntia albicarpa</i> L.) variedad Alfajayucan usada en este trabajo	38
Figura 15	Montaje experimental del proceso de extracción de polisacáridos pécticos de tuna. Tanque agitado enchaquetado acoplado a un agitador Lightnin® con control de agitación y sonda de temperatura.	39
Figura 16.	a) Solución de pectina dentro de las membranas de diálisis b) Pectina seca y pulverizada.	41
Figura 17	Curva de calibración para cuantificación de azúcares totales por el método de Fenol-sulfúrico (Dubois <i>et al.</i> , 1956).	45
Figura 18	Reómetro de esfuerzo controlado TA Instruments AR2000 y geometría de cilindros concéntricos de doble pared usados en esta investigación.	48
Figura 19	Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier de ácido poligalacturónico, pectina de cáscara de tuna (Lira-Ortiz, 2009) y pectina de cáscara de tuna del presente trabajo.	59
Figura 20	Espectros de infrarrojo por transformadas de Fourier. Comparación de ácido poligalacturónico (0% esterificado), pectinas cítricas con grado de metoxilación conocido (30 % y 60%) y pectina de cáscara de tuna del presente trabajo.	60
Figura 21	Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' durante el enfriamiento de soluciones acuosas de pectina de tuna 0.4% p/p. Velocidad de enfriamiento 1°C/min, frecuencia constante de 1 rad/s, las determinaciones se realizaron dentro de la zona lineal de viscoelasticidad usando la geometría de cilindros concéntricos de doble pared. En la parte superior de la Figura se indica la relación estequiométrica $R (=2[Ca^{2+}]/[COO^-])$ de cada trazo. Los trazos gruesos representan G' mientras que los delgados G'' .	62

Figura 22	Evolución del módulo de almacenamiento, G' , con el tiempo durante el curado de geles de pectina de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> L.) 0.4% p/p: Determinaciones realizadas a frecuencia constante de 1 rad/s y 25 °C dentro de la zona lineal de viscoelasticidad. R representa la relación estequiométrica: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$ de cada trazo.	63
Figura 23	Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' con la frecuencia de geles de pectina de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> L.) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Los símbolos negros corresponden a G' y los blancos a G'' .	65
Figura 24	Comportamiento de tangente del ángulo de desfase ($=G''/G'$) de geles de pectina de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i>) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$.	65
Figura 25	Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' durante el enfriamiento de soluciones acuosas de pectina de tuna 0.4% p/p. Velocidad de enfriamiento 1°C/min, frecuencia constante de 1 rad/s, las determinaciones se realizaron dentro de la zona lineal de viscoelasticidad. R indica la relación estequiométrica: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Los símbolos negros corresponden a G' mientras que los blancos a G'' .	67
Figura 26	Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , con el tiempo durante el curado de geles de pectina de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> L.) 0.4% p/p: Determinaciones realizadas a frecuencia constante de 1 rad/s y 25 °C dentro de la zona lineal de viscoelasticidad. R representa la relación estequiométrica: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Símbolos negros corresponden a G' y líneas a G'' .	69
Figura 27	Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' con la frecuencia de geles de pectina de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> L.) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Los símbolos negros corresponden a G' y las líneas a G'' .	71
Figura 28	Comportamiento de tangente del ángulo de desfase ($=G''/G'$) de geles de pectina de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> L.) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$.	72
Figura 29	Efecto de la relación estequiométrica, $R=2[Ca^{2+}]/[COO^-]$ en el módulo de almacenamiento de geles de pectina de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> L.) al 0.4%. Valores a $\omega=1$ Hz y 25°C tomados de la Figura 28	73

NOTACIÓN

		unidades
A	Área	[m ²]
F	Fuerza	[N]
Pa	Pascales	[N m ⁻²]
Hz	Hertz	[s ⁻¹]
G'	Módulo de almacenamiento	[Pa]
G''	Módulo de pérdida	[Pa]
K	Índice de consistencia	[Pa·s ⁿ]
mM	Concentración milimolar	[1x10 ⁻³ mol/L]
p/p	Relación peso-peso	[g/g]
T _{sol-gel}	Temperatura de transición sol-gel	[° C]
T	Temperatura	[° C]
t	Tiempo	[s]
ZVL	Zona de viscoelasticidad lineal	[-]

Símbolos griegos

γ	Deformación de cizalla	[-]
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación	[s ⁻¹]
η	Viscosidad no Newtoniana	[Pa·s]
σ	Esfuerzo cortante	[Pa]
σ_0	Amplitud del esfuerzo de cizalla	[Pa]
μ	Viscosidad newtoniana	[Pa·s]
ω	Frecuencia de oscilación	[rad/s]
δ	Ángulo de desfase entre el esfuerzo y la deformación en cizalla oscilatoria	[-] [rad]
$\tan \delta$	G''/G'	[-]
λ	Tiempo de relajación característico del material	[s]

RESUMEN

Las pectinas son polisacáridos de origen vegetal que en la industria de los alimentos son usados como agentes viscosificantes y/o gelificantes. En la actualidad se buscan nuevas fuentes a partir de las cuales se pueda extraer dicho polímero, considerando principalmente desechos de la industria de alimentos (cáscaras de cítricos, bagazo de manzanas, entre otros), por esta razón se propone el uso de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan, como una posible fuente de pectinas debido a su importancia económica en México. Para este trabajo se extrajo la pectina de cáscara de tuna usando la metodología propuesta por Lira-Ortiz en el 2009.

La pectina extraída fue analizada en su distribución de masas moleculares, determinación de grupos funcionales a través de cromatografía de líquidos y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). El polisacárido presentó una distribución amplia de masas moleculares: 1556 kDa (42.03%), 996.9 kDa (34%), 599.17 kDa (21.55 %) y 777.72 kDa (2.60%). Los análisis de FTIR confirmaron la presencia de un polímero con los rasgos estructurales típicos de pectinas, estimándose un grado de metoxilación en el polisacárido péctico de tuna de alrededor del 30%. Se realizaron pruebas reológicas en cizalla oscilatoria de baja amplitud en soluciones acuosas de pectina extraída de la cáscara de tuna al 0.4% p/p, evaluando el efecto de la relación estequiométrica $R = \frac{2[Ca^{2+}]}{[COO^-]}$, $R=1.56$ a 1.00 y $R=0.33$, 0.22 , 0.11 y 0 en: a) la temperatura de transición sol-gel, evaluada usando el criterio de la temperatura donde el valor del módulo de almacenamiento (G') es igual al valor del módulo de pérdida (G'') durante el enfriamiento de las muestras de 90 a $25^\circ C$; b) las propiedades viscoelásticas de los geles formados a través de la evolución de los módulos G' , G'' y $\tan \delta$ con la frecuencia de oscilación a $25^\circ C$.

El comportamiento reológico de la pectina de tuna estudiada en este trabajo refleja un polisacárido de alto peso molecular, de bajo índice de metoxilación, lo cual lo hace muy reactivo al calcio, gelificando aún a temperaturas cercanas a ebullición. En función de sus propiedades viscosificantes, determinadas previamente por Lira-Ortiz (2009) se sugiere una estructura muy ramificada, lo cual por razones

estéricas genera una gelificación muy dependiente del tiempo. Por otra parte, la posible presencia de grandes ramificaciones en la estructura principal, puede promover puentes de hidrógeno que fortalecen el carácter sólido del sistema reflejándose en valores de G' progresivamente mayores. Sin embargo, cuando el calcio está en exceso ($R > 0.22$) se generan sistemas menos elásticos con diferentes tiempos de relajación, posiblemente por la formación de distintos tipos de enlaces, predominando las asociaciones iónicas muy cooperativas que pueden dar lugar a zonas de unión fuertes de carácter local, presumiblemente entre dímeros de cadenas de ácido galacturónico, que comparten el volumen con zonas amorfas menos entrecruzadas.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1 Reología

El primer uso de la palabra Reología se atribuye a Eugene C. Bingham (cerca de 1928) quien describió que el término tiene relación con παντα ρει (*"panta rhei,"* de las palabras de Heráclito, un filósofo presocrático griego activo alrededor de 500 D. C.) que significa "todo fluye". Actualmente la Reología se define como la ciencia de la deformación y flujo de materia (Steffe, 1996). Para el estudio del comportamiento reológico de los diferentes productos, es necesario recurrir a la reometría, lo que permite conocer propiedades reológicas de materiales en los distintos campos de la industria. También, a través de la reología se puede correlacionar la microestructura de un producto con su comportamiento reológico, lo que permite el desarrollo de nuevos materiales (Ibarz *et al.*, 2005).

1.1.1 Fundamentos de Reología

a) Funciones materiales

Las funciones materiales en el ámbito de reología son parámetros que describen las propiedades reológicas de los materiales bajo determinadas condiciones de proceso o ambientales (temperatura, presión, velocidades de cizallamiento, etc.) (Lapasin *et al.*, 1999). Estos parámetros no dependen de las condiciones experimentales ni del equipo usado, sólo dependen de las características del material y no siempre son valores constantes, de ahí el nombre de funciones materiales. Como ejemplos de funciones materiales están la viscosidad, los coeficientes de esfuerzos normales, el módulo de almacenamiento, el módulo de pérdida, la viscosidad relativa, la viscosidad específica, la viscosidad reducida, la viscosidad intrínseca, etc. Cuando la ecuación constitutiva del material a investigar es conocida se pueden obtener las funciones materiales, como ejemplo están los

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

fluidos newtonianos; los cuales se comportan siguiendo la Ley de Newton de la viscosidad en donde la función material es la viscosidad “ μ ” (Goodwin, 2008).

b) Esfuerzo y deformación

El esfuerzo es definido como la fuerza dividida por el área en la cual éste se aplica. Por lo tanto la unidad en el Sistema Internacional (SI) es el Pascal ($\text{Pa}=\text{N m}^{-2}$). Cuando un esfuerzo es aplicado a un material se genera una deformación (Godwing, 2008; Ibarz *et al.*, 2005). Los esfuerzos se clasifican como esfuerzos de cizalla o de corte, cuando actúan paralelamente al área y esfuerzos normales cuando lo hacen perpendicularmente. Por lo tanto, la deformación de cizalla (γ) es producida cuando se aplica un esfuerzo cortante (σ).

c) Viscoelasticidad

Algunos materiales semilíquidos presentan conjuntamente propiedades de flujo viscoso y propiedades elásticas, denominándose “materiales viscoelásticos”. El conocimiento de las propiedades viscoelásticas es muy útil en el diseño y control de productos alimenticios, así como en la evaluación de su estabilidad frente a condiciones de almacenamiento o de proceso. Los materiales viscoelásticos presentan comportamientos característicos que los diferencian notablemente de otros fluidos. En particular, la viscoelasticidad que presentan algunos materiales como los productos alimenticios no es lineal y es de difícil su caracterización. El comportamiento viscoelástico se puede estudiar y caracterizar usando distintas técnicas. Entre ellas se encuentra la evolución del esfuerzo de cizalla con el tiempo a una deformación fija, la cual se conoce como prueba de relajación de esfuerzos; a partir de esta prueba se puede determinar el carácter sólido o viscoso y realizar un análisis comparativo entre diferentes muestras. Otro tipo de ensayos

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

son los oscilatorios, en los que a la muestra se le aplica un esfuerzo oscilatorio continuo, lo que genera como respuesta en el material una deformación en fase o desfasada del esfuerzo aplicado (Figura 1). Este tipo de pruebas se representa a través de funciones sinusoidales o cosenoidales. Para los sólidos elásticos perfectos la onda de la deformación está en fase con la del esfuerzo aplicado; mientras que para un fluido viscoso perfecto existe un desfase de 90° , como se representa en la Figura 1. En los materiales viscoelásticos el ángulo de desfase está comprendido entre 0 y 90° .

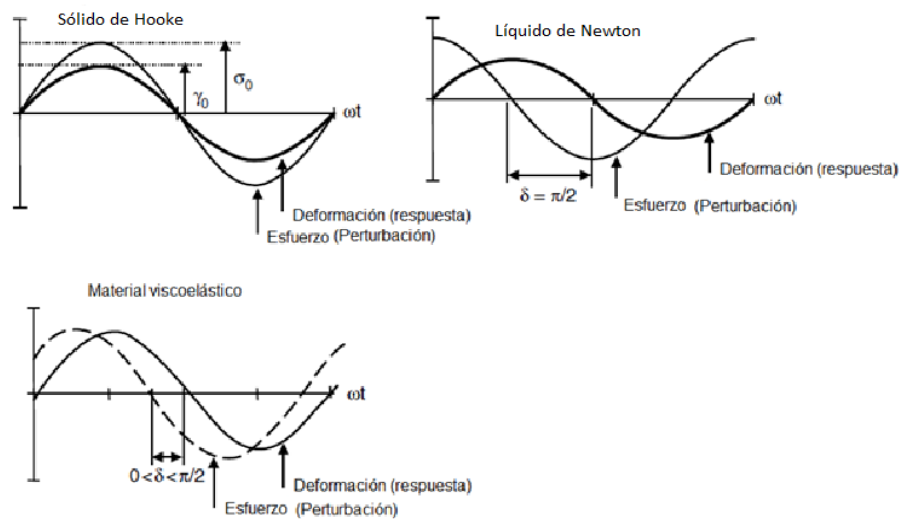


Figura 1. Representación esquemática del comportamiento viscoelástico de sólidos perfectos de Hooke, líquidos viscosos de Newton y materiales viscoelásticos en pruebas reológicas oscilatorias (Gunasekaran y Ak, 2003).

d) Número de Deborah

El número de Deborah se define como la relación entre el tiempo de relajación característico del material, λ , y el tiempo de observación del proceso t (Larson, 1994).

$$De = \frac{\lambda}{t} \quad (\text{Ec. 1.1-1})$$

Este número adimensional se denominó así en alusión a un pasaje bíblico de la profetisa Deborah, narrado en Jueces 5:5 de la Biblia que dice “Las montañas fluirán ante los ojos del señor”. Esto se interpreta que las montañas fluirán ante los ojos de Dios, no de los hombres, porque el tiempo de observación de Dios es infinito (Steffe, 1996).

Es importante recordar que la mayoría de los materiales son viscoelásticos, pero el predominio del carácter viscoso o elástico puede ser diferente en función de sus características materiales y de los esfuerzos aplicados. Si el material es un sólido elástico perfecto $\lambda = \infty$ y no ocurre relajación. Con un material viscoso ideal $\lambda = 0$, esto quiere decir que la relajación ocurre al instante (Steffe, 1996).

1.1.2 Pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud

Este tipo de pruebas se clasifican dentro de las pruebas de reología dinámica y son usadas para determinar las propiedades viscoelásticas de materiales (Rao, 1999). Este tipo de determinaciones reométricas se pueden llevar a cabo usando distintas geometrías de medición, como plato-cono, placas paralelas o cilindros concéntricos. En experimentos de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud, la

deformación oscilatoria aplicada al material a una frecuencia ω , es lo suficientemente pequeña en amplitud para no colapsar la estructura del material, es decir debe existir una relación lineal entre el esfuerzo y la deformación. En las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud, conocidas como pruebas SAOS por sus siglas en inglés, la deformación aplicada al material a un tiempo t se describe a través de la ecuación 1.2-1

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (\text{Ec. 1.1-2})$$

Donde γ_0 es la amplitud de la deformación y ω es la frecuencia angular. La respuesta del material a esta perturbación sería:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad (\text{Ec. 1.1-3})$$

A partir de la ecuación 1.1-2 y usando la identidad trigonométrica indicada abajo (Ec. 1.1-4),

$$\cos(x \pm y) = \cos x \cos y \mp \sin x \sin y \quad (\text{Ec. 1.1-4})$$

se obtiene:

$$\sigma = \sigma_0 \cos \delta \cdot \cos \omega t - \sigma_0 \sin \delta \cdot \sin \omega t \quad (\text{Ec. 1.1-5})$$

Dividiendo la ecuación 1.1-5 entre γ_0 :

$$\frac{\sigma}{\gamma_0} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \cdot \cos \omega t - \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \cdot \sin \omega t \quad (\text{Ec. 1.1-6})$$

A partir de la ecuación 1.1-6 se pueden deducir las funciones materiales denominadas G' y G'' , las cuales no dependen de las variables experimentales ω y t .

$$G' \equiv \left[\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right] \cos \delta \quad (\text{Ec. 1.1-7})$$

$$G'' \equiv \left[\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right] \text{sen } \delta \quad (\text{Ec. 1.1-8})$$

Sustituyendo la definición de los módulos G' y G'' (Ecuaciones 1.1-7 y 1.1-8) en la ecuación 1.1-6 se obtiene:

$$\frac{\sigma}{\gamma_0} = G' \cos \omega t - G'' \text{sen } \omega t \quad (\text{Ec. 1.1-9})$$

Tangente de delta ($\tan \delta$) es la relación que existe entre los valores de los módulos dinámicos G' y G'' (Ec. 1.1-10);

$$\frac{G''}{G'} = \frac{\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \text{sen } \delta}{\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta} = \tan \delta \quad (\text{Ec. 1.1-10})$$

Por lo tanto:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (\text{Ec. 1.1-11})$$

Donde, G' es el módulo de almacenamiento, G'' es el módulo de pérdida y $\tan \delta$ es la tangente del ángulo de pérdida. El módulo de almacenamiento G' expresa la magnitud de la energía que es almacenada o recuperada por el material por cada ciclo de deformación. G'' es la medida de la energía que se pierde en cada ciclo de deformación. Para un sólido perfecto toda la energía es almacenada; de tal manera que G'' es cero y el esfuerzo y la deformación están en fase. En contraste para un líquido que no tiene propiedades elásticas, toda la energía se pierde en

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

forma de calor, así para este caso G'' es cero y el esfuerzo y la deformación están desfasados 90° . Para cualquier material, las magnitudes de G' y G'' dependen de la frecuencia de oscilación, la temperatura y el esfuerzo aplicado (Gunasekaran y Ak, 2003).

1.1.2.1 Tipos de pruebas oscilatorias en régimen lineal

En las pruebas oscilatorias se consideran cuatro variables experimentales: deformación (o esfuerzo), frecuencia, temperatura y tiempo; por lo tanto se pueden hacer distintas pruebas cambiando una o mas variables (Gunasekaran y Ak, 2003).

a) Barrido de deformación (o barrido de esfuerzo)

En este tipo de prueba los valores de los módulos dinámicos son medidos en función del incremento de la deformación aplicada al material manteniendo la frecuencia de oscilación constante, por lo general la frecuencia usada es 1 Hz. El objetivo de este barrido es determinar la deformación o esfuerzo crítico, γ^* y σ^* , respectivamente, a partir del cual se pierde la relación lineal entre γ y σ , es decir, a partir de los cuales los módulos dinámicos (G' , G'') están en función de la deformación o esfuerzo aplicado. Los valores de γ^* y σ^* delimitan la zona lineal de viscoelasticidad (ZVL) (Figura 2).

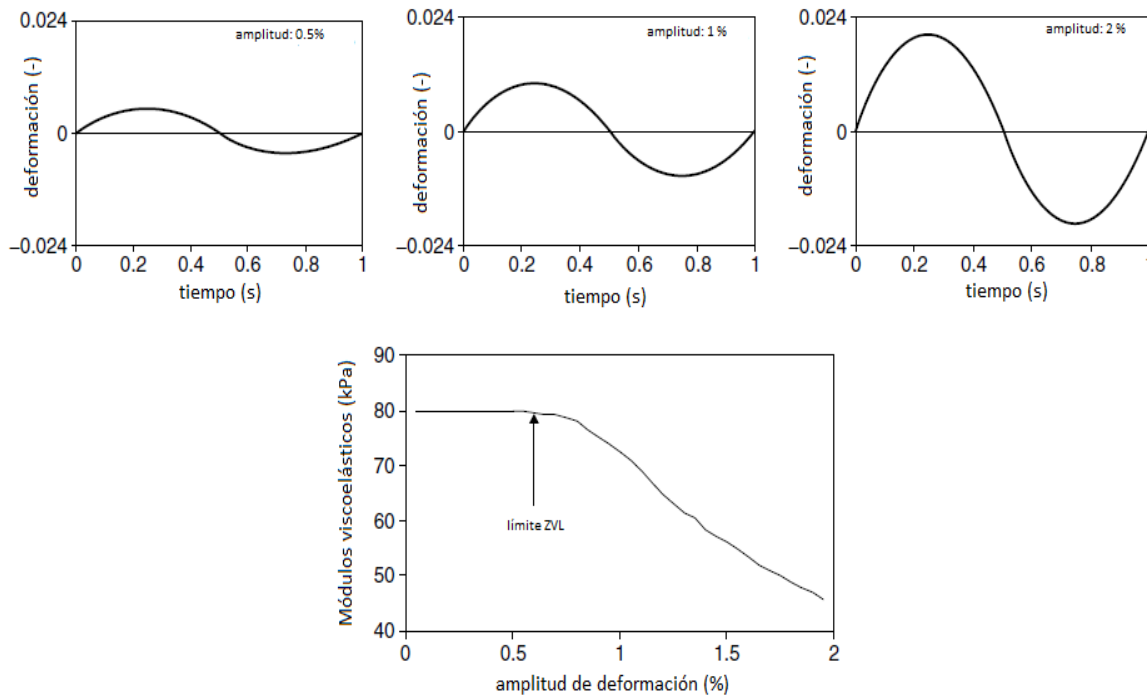


Figura 2. Representación esquemática del barrido de deformación a frecuencia constante (1 Hz), con un ejemplo del comportamiento de los valores de los módulos viscoelásticos y la representación de la zona de viscoelasticidad lineal (ZVL) (Modificado de Gunasekaran y Ak, 2003).

b) Barrido de frecuencia

En este tipo de prueba, se impone al material un esfuerzo sinusoidal para determinar los valores de los módulos dinámicos en un intervalo de frecuencias (Figura 3). La gráfica que se obtiene es conocida como “espectro mecánico” de un material. La amplitud de la deformación usada en esta prueba debe estar dentro de la ZVL para asegurar que el material no haya sido fracturado. Para pruebas de este tipo usualmente se utiliza un intervalo de frecuencias de 0.01 Hz a 100 Hz.

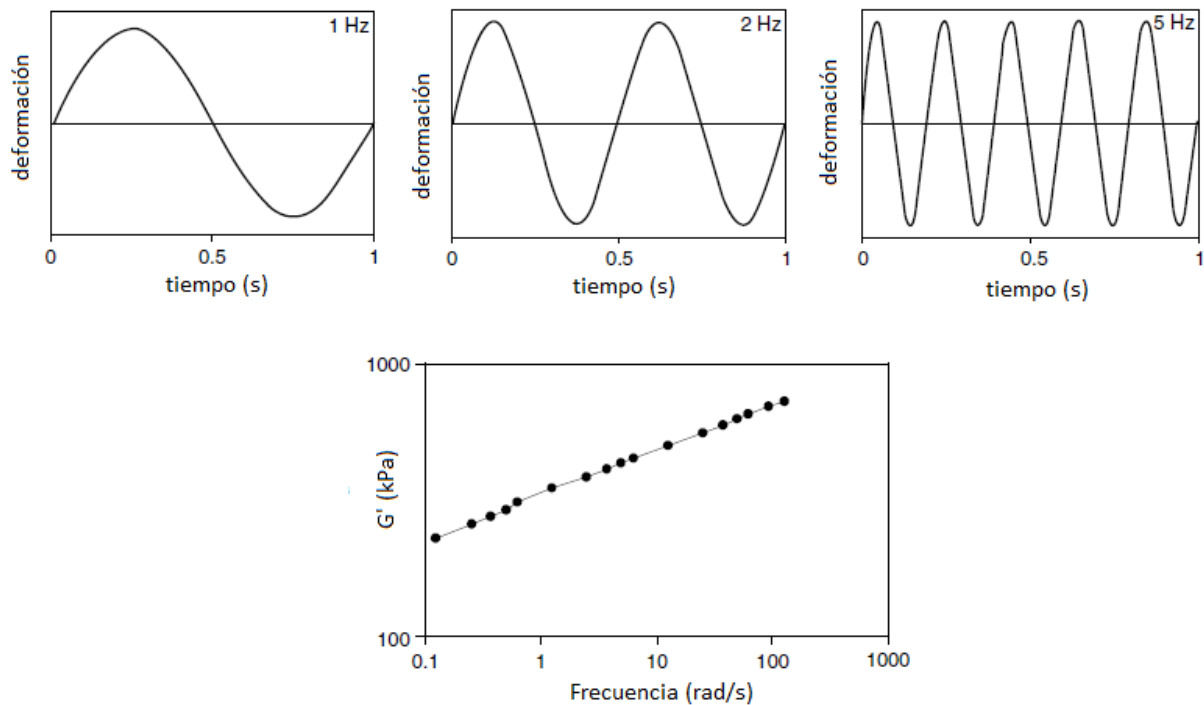


Figura 3. Barrido de frecuencia usando una amplitud de deformación constante, se muestra también (abajo) un ejemplo de la dependencia del módulo de almacenamiento con la frecuencia (Modificado de Gunasekaran y Ak, 2003).

c) Barrido de temperatura

Las pruebas de barrido de temperatura (Figura 4), involucran la medida de los módulos dinámicos dentro de un intervalo de temperatura, con valores de frecuencia y amplitud de deformación constante. Este tipo de pruebas se usan para conocer la transición de fases o fenómenos dependientes de la temperatura. Por ejemplo, en el caso de la gelificación de los polisacáridos la temperatura a la cual los módulos dinámicos se entrecruzan ($G'=G''$) se considera como temperatura de gelificación.

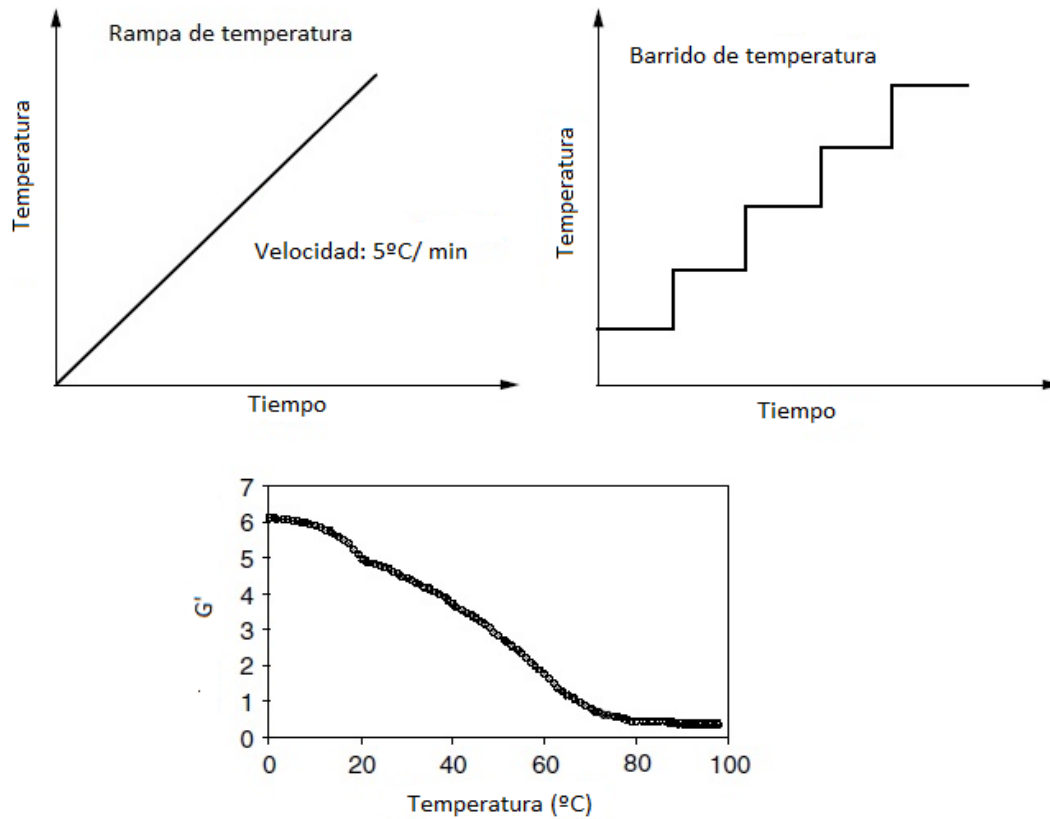


Figura 4. Representación de una prueba oscilatoria usando rampa y un barrido de temperatura: Se muestra también un ejemplo de la evolución del módulo G' con la temperatura.

d) Barrido de tiempo

Las mediciones del barrido de tiempo se hacen de forma isotérmica y a deformación y frecuencia constantes. A esta prueba también se le llama “prueba de curado de gel”. En la práctica, esta prueba se hace usualmente con una frecuencia de 1 Hz. La finalidad es monitorear la evolución de los módulos dinámicos con el tiempo (Figura 5).

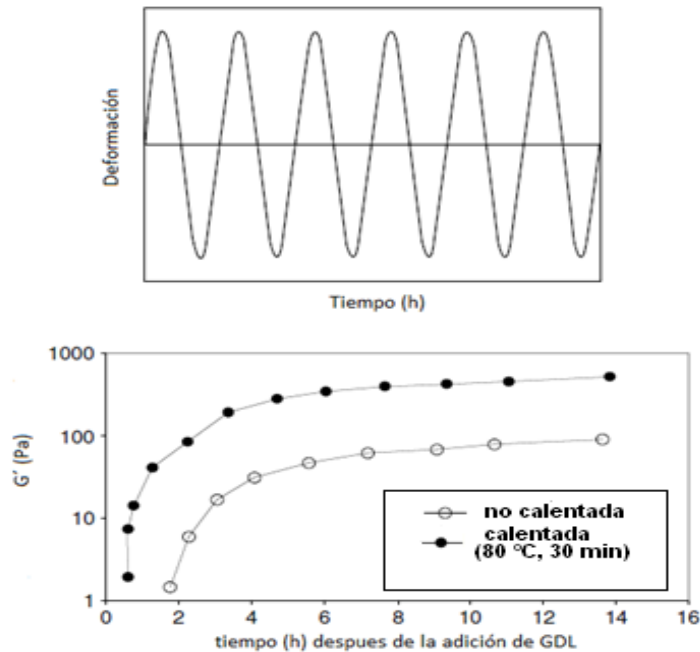


Figura 5. Representación de una prueba oscilatoria en donde se realiza un barrido de tiempo con valores de temperatura y frecuencia constantes. Ejemplo de este tipo de pruebas es la gelificación de la leche a 40 °C por efecto de glucono delta lactona (GDL) (Gunasekaran y Ak, 2003).

1.2 Geles

Flory (1953) define a un gel como un conjunto de moléculas poliméricas entrecruzadas de tal manera que forman una red inmersa en un medio líquido. Por otra parte, Hermans (1949) lo define como un sistema de dos componentes (polímero gelificante-disolvente) formado por sólidos finamente dispersos en una fase líquida, que exhiben comportamiento sólido bajo ciertas condiciones de deformación. A nivel molecular, la gelificación es la formación de enlaces formados por moléculas poliméricas. En algunos productos alimenticios, la gelificación de polisacáridos y/o proteínas es el principal factor que influye en la textura, la mayoría de estos biopolímeros forman geles físicos; es decir estructuras

formadas por interacciones débiles no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas). De acuerdo con Flory (1974) se forman geles físicos debido a agregaciones, casi siempre desordenadas; en algunas ocasiones los geles son termorreversibles (Rao, 1999).

1.2.1 Clasificación de los geles

Clark y Ross-Murphy (1987) clasificaron a los geles de biopolímeros en base al nivel de orden de las macromoléculas antes y durante la formación de redes.

- a) Geles que forman interacciones desordenadas de biopolímeros
- b) Geles que forman redes que involucran interacciones específicas entre partículas densas y menos flexibles.

En la primera categoría, la transición es inducida por un descenso en la temperatura (gelatina, carragenina) o por un cambio en la composición del disolvente al introducirle iones específicos (alginatos, pectinas de bajo metoxilo). Estos geles pueden ser considerados como homogéneos a nivel molecular y son descritos como “entrecruzamientos asociados”. En la segunda categoría, la gelificación está inducida por el incremento de la temperatura (geles de proteína desnaturalizada) o por medios enzimáticos (coagulación de la leche). En el caso de los alginatos y de los geles de pectina de bajo metoxilo, por ejemplo, las interacciones son originadas por puentes entre iones, involucrando la presencia específica de cationes divalentes, tal como el Ca^{2+} . Las uniones no son permanentes y probablemente se deshacen y cambian constantemente. Sin embargo, los sistemas que muestran reológicamente un comportamiento sólido, es debido a que el tiempo de observación es más corto que el tiempo de vida de las uniones físicas que mantienen la estructura de dicho sistema. Basados en el comportamiento macroscópico de los sistemas, se pueden distinguir dos tipos de geles (Doublier y Cuvelier, 1996):

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

- a) Los denominados geles “verdaderos” o “fuertes” y
- b) Los geles denominados “débiles”

Clark y Ross-Murphy (1987) definen a los geles fuertes como aquéllos en los que los enlaces que forman sus redes tienen energía finita, y a los geles débiles como aquellos sistemas en los que cambia la energía de sus enlaces con respecto al tiempo. Para conocer si un gel es fuerte o débil, se lleva a cabo la prueba de espectro mecánico, en la que se mide la dependencia de los módulos viscoelásticos con la frecuencia. Normalmente los valores de G' son más grandes que los valores de G'' , dentro de cierto rango de frecuencias; en algunos casos G' es dependiente de la frecuencia (ω). Para los geles débiles esta dependencia de los módulos es grande, lo cual sugiere la existencia de un proceso de relajación que ocurre en una escala corta de tiempo. Si se observa una pequeña diferencia entre los valores de los módulos dinámicos (G' , G''), esto indica que sólo se recupera un pequeño porcentaje de energía (Rao, 1999).

1.3 Pectinas

La palabra pectina procede de las palabras griegas “*pectos*” que significa coagulante; fue utilizada por primera vez por el químico francés Branconnot en 1824 para denominar a una sustancia que encontró en varios frutos. Esta sustancia fue obtenida como extracto y se observó que formaba un gel cuando se le mezclaba con alcohol y azúcar. A partir de este reporte los científicos han realizado esfuerzos para conocer los distintos aspectos de las pectinas, incluyendo estructura, localización en la pared celular de las plantas y las propiedades reológicas de sus soluciones y geles (Steinbüchel y Ki, 2005).

Las sustancias pécticas comprenden un extenso grupo de heteropolisacáridos vegetales cuya estructura básica está integrada por moléculas de ácido D-galacturónico, unidas por enlaces glucosídicos α -D- (1,4), en la que algunos de los grupos carboxilo se encuentran esterificados con metilos o en forma de sal. Las pectinas se encuentran asociadas con otros hidratos de carbono, principalmente con hemicelulosas en las paredes celulares de los vegetales y son responsables de la firmeza de estos productos (Oosterveld *et al.*, 2002).

Se pueden distinguir dos clases principales de sustancias pécticas: los ácidos pectínicos, que tienen una pequeña porción de sus ácidos poligalacturónicos como ésteres metílicos, y los ácidos pécticos que sólo contienen moléculas de ácido poligalacturónico libre de esterificación. Por definición las pectinas son ácidos pectínicos con diferentes grados de esterificación y neutralización, que pueden contener de 200 a 1000 unidades de ácido galacturónico. Existen otros compuestos de este tipo, las protopectinas, altamente esterificadas con metanol y muy insolubles en agua, que se encuentran en tejidos inmaduros de los frutos y son responsables de su textura rígida; sin embargo la acción de la enzima protopectinasa hace que se conviertan en pectinas solubles o ácido pectínicos en un proceso que ocurre durante la maduración y que trae consigo el ablandamiento del fruto (Steinbüchel y Ki, 2005; Oosterveld *et al.*, 2002).

La pared celular es el componente estructural típico de las células vegetales, que forma una matriz extracelular capaz de controlar los procesos de crecimiento y desarrollo celular, sus principales funciones son: a) mantener la forma de la célula madura, controlar la distensión del protoplasto provocada por el agua que ingresa a las vacuolas, brindar soporte mecánico a las células y por ende, a los tejidos, a los órganos y a la planta misma, brindar protección para patógenos. Se compone de tres capas (Figura 6): pared primaria, secundaria, y lámina media. La lámina

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

media es la capa más externa, su función principal es la de servir como material cementante entre células, está constituida por sustancias pécticas. La pared primaria esta después de la lámina media hacia adentro, es una capa delgada, plástica y extensible para permitir el crecimiento de la célula, es muy hidratada y está atravesada por numerosos plasmodesmos. La pared secundaria es la capa más interna, se desarrolla cuando la células concluyen su crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006).

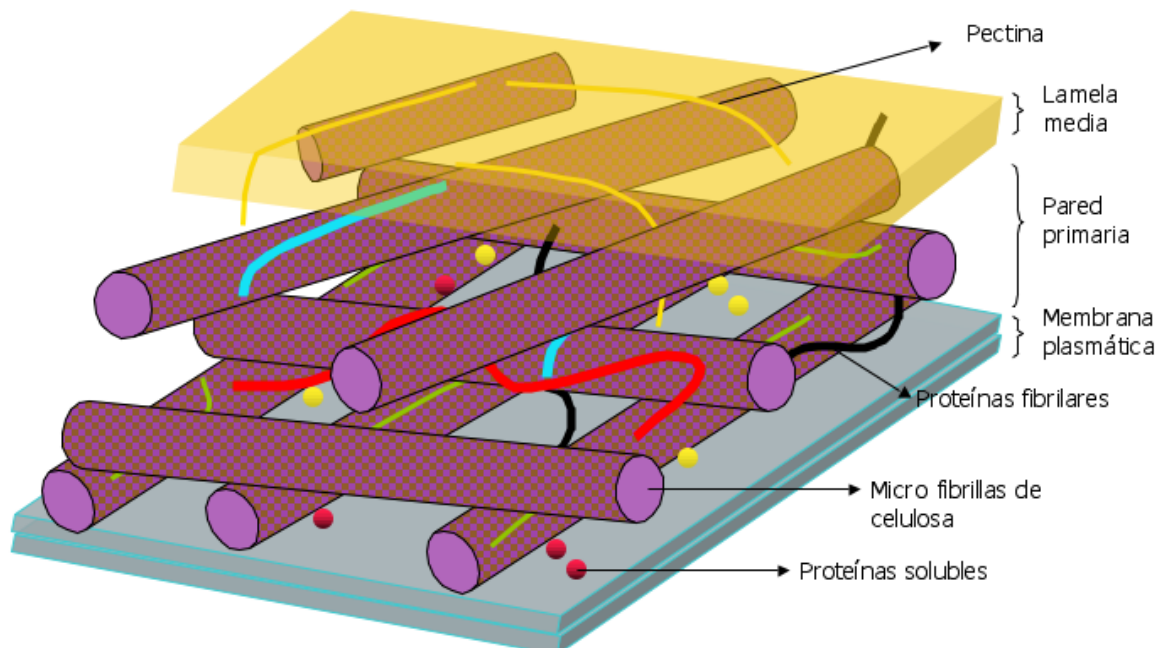


Figura 6: Distribución de la pectina en la pared celular (Taiz y Zeiger, 2006).

Las pectinas se encuentran en mayor cantidad en los frutos inmaduros y especialmente en algunos tejidos, como en la cáscara de los cítricos (naranja, limón, toronja, lima), en las manzanas, las peras, etc. Aún dentro del propio

vegetal, existe una distribución de las pectinas; las más esterificadas están en la parte más interna y las menos esterificadas en la periferia. Excepto en algunos productos como la remolacha y la espinaca, cuyas pectinas contienen una pequeña fracción de ácido ferúlico (0.6%) unido a los grupos no reductores y en otras frutas y hortalizas, la mayoría de las pectinas están constituidas de manera exclusiva por residuos parcialmente esterificados de ácido galacturónico (Oosterveld *et al.*, 2002).

La funcionalidad de las pectinas y por ende su posible aplicación, dependen de factores intrínsecos como su peso molecular y su grado de esterificación (que a su vez depende de la materia prima, de las condiciones de su fabricación, etc.), y por factores extrínsecos, tales como el pH, las sales disueltas y la presencia de azúcares. La viscosidad de sus dispersiones, al igual que la de otros polisacáridos, se incrementa a medida que aumenta el peso molecular; en el caso de las pectinas, la viscosidad es mayor cuanto más se incrementa el grado de esterificación. Las pectinas desempeñan un papel muy importante en la industrialización de las frutas, como la elaboración de jaleas (manufacturadas con pectina de bajo grado de esterificación), gelatinas (con pectinas de alta esterificación) o geles similares y, sobre todo en lo relacionado con la elaboración de bebidas. Las pectinas se emplean también en la elaboración de productos de relleno y de glaseado en panificación, para la estabilización de productos lácteos (pasteurizados, esterilizados o acidificados) y en la industria de la confitería.

La obtención industrial de las pectinas se hace a partir de la cáscara de los cítricos. Durante las distintas etapas de su extracción se pueden generar muchos cambios químicos debido a la utilización de ácidos para su extracción, la temperatura de extracción o la acción de enzimas endógenas; principalmente ocurre la hidrólisis de los enlaces éster metoxílico (desmetoxilación) y glucosídico

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

(despolimerización) que traen consigo una reducción de calidad, puesto que las pectinas se cotizan más cuanto menos degradaciones presenten (Steinbüchel y Ki, 2005).

1.3.1 Composición química de las pectinas

La pectina, tal como se encuentra en la pared celular de las plantas, están compuestas principalmente por tres estructuras de polisacáridos: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) (Figura 7). Los homogalacturonanos son homopolímeros lineales de ácido galacturónico unidos por enlaces α -(1→4), se estima que contienen aproximadamente de 100 a 200 unidades de ácido galacturónico. Los RG-I son compuestos altamente ramificados, comúnmente dan lugar a la región “ramificada” de las pectinas. La estructura principal consiste de más de 100 unidades de disacáridos formados por α -L- (1→2) ramnosa y α -D-(1→4) ácido galacturónico.

Se ha propuesto que aproximadamente del 20 al 80% de la ramnosa está unida en los carbonos C-3 o C-4, formando desde uno hasta más de cincuenta cadenas compuestas de los distintos azúcares neutros. En cuanto a los azúcares neutros, la composición en las pectinas varía de acuerdo con la fuente, siendo los más comunes galactosa y arabinosa (Albersheim *et al.*, 1996). Se ha encontrado también que las cadenas de RG-I tienen la habilidad de formar enlaces con unidades de ácido ferúlico (Oosterveld *et al.*, 2000).

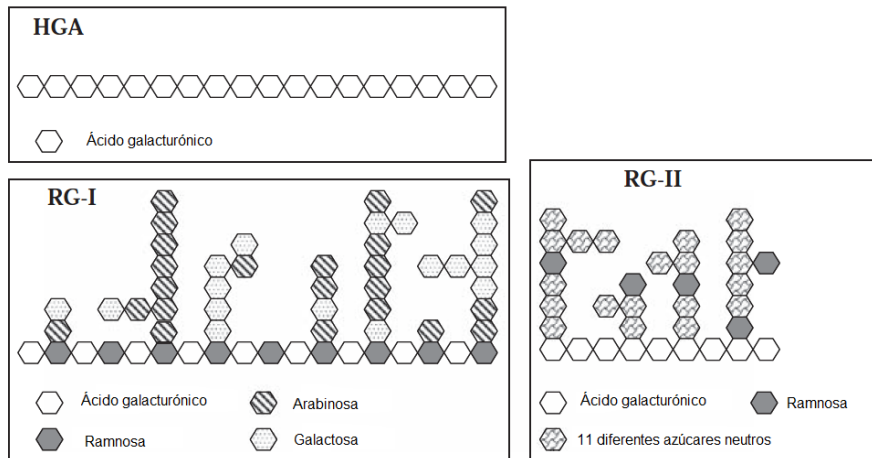


Figura 7. Esquema de los tres principales polisacáridos que componen la estructura de la pectina, homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) (CP Kelco, 2010).

La estructura de RG-II es muy compacta y está compuesta por cadenas de homogalacturonanos con aproximadamente nueve unidades de ácido galacturónico. En este tipo de compuesto se encuentran también los distintos azúcares neutros, que incluyen apiosa, fucosa, xilosa, entre otros. (Brejnholt, 2010).

1.3.2 Fuentes de pectinas

A nivel industrial, las pectinas han sido extraídas durante años de manzana, cáscara de cítricos (principalmente lima, limón y naranja) y en menor cantidad de remolacha azucarera. Sin embargo, en los últimos años se han propuesto distintas fuentes como alternativa para la extracción de pectinas (Ovodov, 2009).

Cuadro 1. Fuentes a partir de las cuales se han aislado polisacáridos pécticos (Ovodov, 2009).

Familia	Nombre científico	Nombre común
Fabaceae	<i>Lupinus albus</i> L.	Lupino blanco
	<i>Lupinus mutabilis</i> L.	Lupino
	<i>Pisum sativum</i>	Chícharo
	<i>Glycine max</i> L.	Soya
Curcubitaceae	<i>Curcubita pepo</i> L.	Calabaza
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i> spp..	Amaranto
	<i>Beta vulgaris</i> L.	Remolacha azucarera
Menispermaceae	<i>Cissampelos pareira</i> L.	Vid leñosa de Tailandia
Rosaceae	<i>Prunus avium</i> L.	Cerezos
	<i>Pérsica vulgaris</i> L.	Duraznos
	<i>Malus domestica</i> L.	Manzana
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i> L.	Girasol
Iridaceae	<i>Iris pseudacorus</i> L.	Lirio amarillo
Oleaceae	<i>Olea europea</i> L.	Olivo
Apiaceae	<i>Centella asiática</i> L.	Centella asiática
Cactaceae	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. M.	Tuna, nopal
	<i>Opuntia albicarpa</i> S. var. Alfajayucan	Nopal tuna blanca
Araliaceae	<i>Panax ginseng</i> L.	Ginseng
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i> L.	Llantén
Sapotaceae	<i>Argania spinosa</i> L.	Árbol de argan
Chenopodiaceae	<i>Spinaca oleraceae</i> L.	Espinaca
Rutaceae	<i>Citrus sinesis</i> L.	Naranja
	<i>Citrus reticulata</i> L.	Mandarina
	<i>Citrus limón</i> L.	Limón

1.3.3 Clasificación comercial de las pectinas

De acuerdo con el Codex Alimentario (directiva del 11 de noviembre 1998; Food Chemical Codex, Edición 5, 2003) y la FAO (2001), al menos el 65 % del

contenido de pectina debe ser ácido galacturónico, para que un polisacárido péctico pueda ser considerada como pectina comercial. Las unidades de ácido galacturónico pueden estar o no esterificadas con grupo metilo, y dependiendo del grado de metil-esterificación, las pectinas son divididas en dos grupos que comprenden a las de alta esterificación (HM) y las de baja esterificación (LM), con un porcentaje de ácido galacturónico esterificado mayor y menor al 50%, respectivamente. Además, existe la alternativa de la pectina amidada (Brejnholt, 2010). La estructura básica de las unidades de ácido galacturónico en las diferentes pectinas comerciales se muestra en la Figura 8.

Las pectinas obtenidas de algunas fuentes como la remolacha azucarera pueden tener unidades de ácido galacturónico O-acetiladas. Este tipo de pectinas se comporta de manera muy distinta a la de la pectina obtenida de fuentes tradicionales pues no gelifica, por lo tanto su uso se limita a agente estabilizante y emulsificante (Brejnholt, 2010).

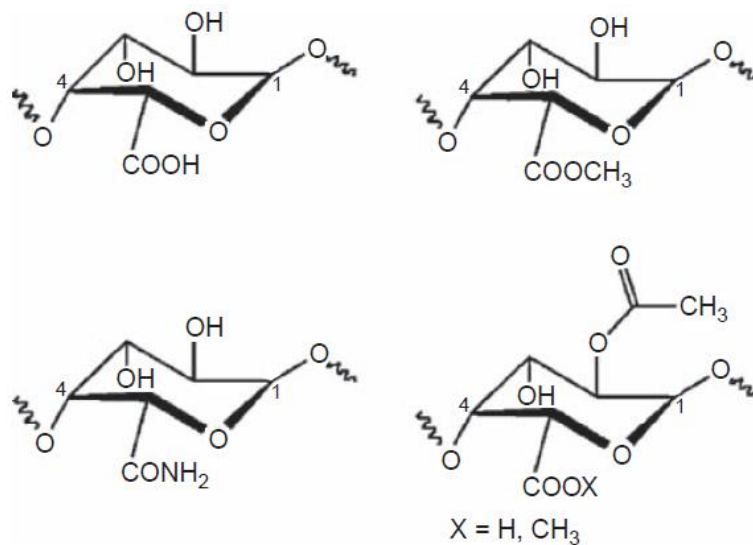


Figura 8. Unidades de ácido galacturónico y su presentación en moléculas de pectina; de izquierda a derecha: molécula no esterificada, metil esterificada, amidada y acetilada (Brejnholt, 2010).

1.3.4 Mercado de la pectina

Con una velocidad de crecimiento de aproximadamente 3.5% por año, el mercado mundial de la pectina se ha duplicado durante los últimos 20 años. La Figura 9 muestra el comportamiento del mercado mundial desde 1982 en donde las ventas fueron de 16,000 toneladas métricas; hasta el año 2005 el volumen fue estimado en 34,000 toneladas métricas. Las empresas que cubren este mercado son CP Kelco, Cargill, Danisco, Herbstreith & Fox y Obipektin (CP Kelco, 2005; Citado en Brejnholt, 2010).

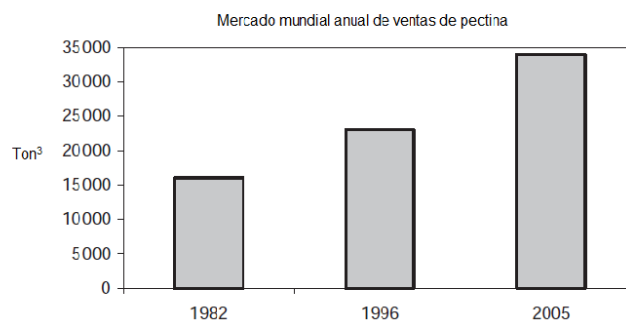


Figura 9. Desarrollo del mercado mundial de pectina desde 1982 al 2005 (Brejnholt, 2010).

Tradicionalmente la pectina se usa como agente gelificante en mermeladas y jaleas, sin embargo en los últimos años, han surgido nuevas áreas de aplicación como se muestra en la Figura 10.

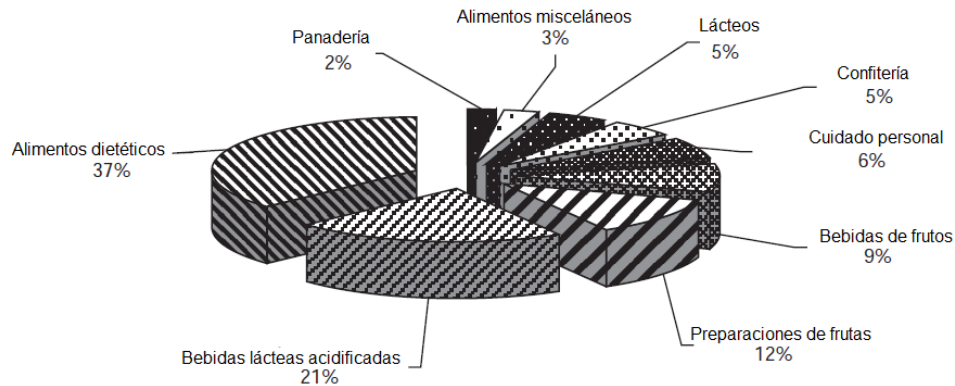


Figura 10. Aplicaciones de pectina, en panificación se incluyen productos como pan, pasteles; alimentos misceláneos incluye mayonesa, salsas, pastas con bajo contenido de calorías, preparaciones de cárnicos, postres; productos lácteos incluyen yogur y postres lácteos; confitería incluye gomitas y mermeladas. Bebidas de frutos incluyen jugos, bebidas carbonatadas, bebidas no lácteas, licores, bebidas lácteas neutras; preparaciones de frutas abarcan principalmente yogur con fruta, bebidas lácteas acidificadas incluye leche y bebidas de soya (CP Kelco, 2005; Citado en Brejnholt, 2010).

1.3.5 Mecanismo de gelificación de las pectinas

Las pectinas son polisacáridos gelificantes, cuyos geles son más fuertes a medida que se incrementa el peso molecular de la pectina (Willats *et al.*, 2006). Las pectinas de alto metoxilo forman geles en condiciones ácidas y en presencia de azúcar, las pectinas de bajo metoxilo forman geles en un amplio rango de valores de pH y con bajas concentraciones de azúcar, pero requieren de la presencia de cationes, generalmente calcio. Se distinguen 2 mecanismos de gelificación de acuerdo con el grado de metil esterificación de las pectinas.

a) Geles de pectinas de alto metoxilo

Para formar geles requieren la presencia de bajo pH y baja actividad de agua. Generalmente requieren un rango de pH de 2.5 a 3.8 y el contenido de sólidos solubles es de 55% a 85%. Un alto contenido de sólidos genera baja actividad de

agua, por lo tanto se favorecen las interacciones pectina-pectina, y un bajo pH reduce la disociación de los grupos carboxilo, por lo que disminuye las repulsiones electrostáticas. El mecanismo de gelificación es debido a puentes de hidrogeno entre grupos carboxilo no disociados y grupos alcohol secundarios, al igual que interacciones hidrofóbicas entre grupos éster metilo (Williams *et al.*, 2002).

Debido a la importancia del grado de metil esterificación en geles de pectina de alto metoxilo, hay varias presentaciones comerciales de este tipo de pectina, basadas en tiempo y temperatura de gelificación. Los grupos incluyen gelificación ultra rápida, rápida, medio rápida, lenta y extra lenta, con rangos de esterificación de 74 – 77 % para ultra rápido, y 58-60% para extra lento. Para bajos valores de pH, el tiempo de gelificación incrementa y disminuye la temperatura de gelificación (Coulter, 2009).

b) Geles de pectinas de bajo metoxilo

El mecanismo de gelificación de pectinas de bajo metoxilo involucra la presencia de cationes divalentes, usualmente calcio. El mecanismo se ilustra usando el modelo de “caja de huevo” mostrado en la Figura 11. De acuerdo a este modelo, las cadenas de pectina se doblan simétricamente formando una serie de espacios electronegativos en los cuales los cationes divalentes se disponen de acuerdo con su afinidad. De esta manera, los cationes forman dímeros de cadenas de ácido poligalacturónico por interacciones iónicas con los ácidos carboxílicos libres de la cadena de pectina (Brehnholt, 2010).

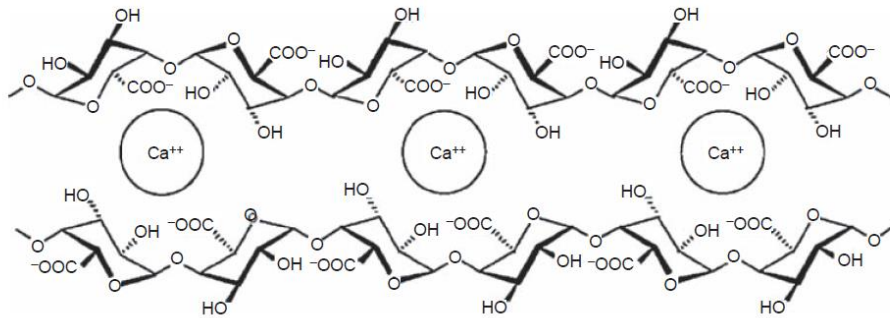


Figura 11. Modelo de caja de huevo que representa el mecanismo de gelificación para pectinas de bajo grado de metoxilación (CP Kelco, 2005; Citado por Brejnholt, 2010).

1.3.6 Propiedades emulsificantes de pectinas

Las pectinas son extensamente usadas en la industria de los alimentos como agentes espesantes y gelificantes. Sin embargo, existen reportes antiguos en donde se sugiere su uso en emulsiones (Rooker, 1927). Estudios posteriores reportaron la presencia de fragmentos de proteína en pectinas comerciales, los cuales permanecen en su estructura después del proceso de extracción (Kravtchenko, *et al.*, 1992; Oosterveld, *et al.*, 2002). La presencia de proteína en pectinas ha sido significativamente mayor en el caso de pectina de remolacha azucarera (10.4%) comparada con pectina de manzana (1.6%) y pectina cítrica (3-3.3%) (Williams *et al.*, 2005). No obstante, que este contenido de proteína en remolacha azucarera se ha asumido como la explicación a las propiedades emulsificantes de esta pectina (Leroux *et al.*, 2003), han surgido otras hipótesis para explicar el origen de las propiedades de superficie de pectinas. Endreß y Rentschler, (1999) concluyen en sus estudios que las propiedades de emulsificación de la pectina de remolacha azucarera se deben a la presencia de grupos acetilo (4-5%). Sin embargo, se han reportado propiedades emulsificantes en pectinas cítricas, las cuales son pobres en grupos acetilo (Akhtar *et al.*, 2002). Estos autores reportaron que las pectinas cítricas de baja masa molecular (60-70

kgmol) y alto grado de metoxilación fueron las que mostraron las mejores propiedades emulsificantes.

Un estudio más reciente mostró a través de mediciones dinámicas de tensión superficial, que aunque las pectinas de manzana, de cítricos y de remolacha azucarera reducen la tensión superficial, la pectina de esta última fuente produce la mayor reducción. La tensión interfacial de una solución al 2% de pectina de remolacha azucarera fue similar a la obtenida por una solución al 15% de goma arábica (Leroux *et al.*, 2003). El origen de estas propiedades de superficie encontradas en algunas pectinas, dentro de las cuales destaca la pectina de remolacha azucarera, debe de ser estudiado con mayor profundidad, ya que aún no es evidente el papel que tienen los grupos acetilo, grupos éster, fracciones proteínicas e incluso la presencia de ácido ferúlico, el cual también se asocia con las propiedades de superficie de pectinas (Williams *et al.*, 2005).

1.3.7 Propiedades reológicas de pectinas de bajo metoxilo

La gelificación de pectinas de bajo metoxilo se ha descrito como un proceso complejo (Grosso y Rao, 1998). La determinación del “punto de gel” o temperatura de transición sol-gel experimentalmente se vuelve complicado debido a que factores intrínsecos (masa molecular, grado de metoxilación, distribución de las moléculas de ácido galacturónico en la estructura, ramificaciones en la estructura principal) como extrínsecos (pH, temperatura, concentración de contraiones) influyen en la formación de zonas de unión y fuerza del gel (Fraeye *et al.*, 2009).

Durante la gelificación, un polímero sufre una transición de fase desde un estado líquido a un estado gel. La transición sol-gel es un punto crítico donde alguna escala de longitud característica (el tamaño de las asociaciones moleculares)

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

diverge. Es una transición entre un sol donde los monómeros no están conectados a un gel donde éstos se conectan. No es una transición termodinámica, no sucede nada especial con la energía interna, y no está asociada a fluctuaciones de concentración de polímero (Joanny, 1989; Citado en Lopes da Silva y Rao, 2007). Por lo tanto, independientemente del sistema estudiado o del mecanismo involucrado, la gelificación es un fenómeno crítico donde la variable de transición será la conectividad de los enlaces químicos (enlaces covalentes principalmente) o físicos (interacciones van der Waals, asociaciones iónicas, interacciones hidrofóbicas). Consecuentemente, las propiedades reológicas serán unos indicadores sensibles del punto crítico de gelificación (Lopes da Silva y Rao, 2007).

En biopolímeros se acepta como “punto de gel” al instante en tiempo o la temperatura específica en la cual ocurre la transición sol-gel. En el caso de las pectinas de bajo metoxilo, cuya gelificación ocurre por asociaciones polímero-polímero a través de puentes de calcio, principalmente (ver sección 1.3.5); el punto de gel se define a través de la temperatura de transición sol-gel (T_{gel}). En estos sistemas, antes del punto de gel la conectividad del polisacárido es pequeña y el material relaja rápidamente sus esfuerzos, “fluye”, conforme se acerca al punto de gel, el tiempo de relajación se incrementa manifestando poco a poco un carácter sólido.

Ross-Murphy (Ross-Murphy, 1991; Citado en Núñez-Santiago, 2007) describió cuatro procedimientos para establecer el punto de gelificación: 1) cuando la viscosidad tiende a ser infinita en una prueba de cizalla estacionaria, 2) cuando G' diverge del “ruido característico de la señal del reómetro”, 3) cuando G' muestra un máximo y 4) cuando $G'=G''$ ($\tan \delta=1$) durante la evolución de los módulos en un experimento de curado de gel. El primer experimento es excluido porque es

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

irrealizable en la práctica. Frecuentemente se usa como criterio para determinar el punto de gel en polisacáridos, la temperatura a la cual G' y G'' se entrecruzan a una frecuencia dada, este criterio ha sido aplicado a la gelificación de algunos biopolímeros como gelatina, β -lactoalbúminas, maltodextrinas y carrageninas. Sin embargo, el punto de gel es una propiedad intrínseca del material y no puede ser dependiente de la frecuencia en los experimentos dinámicos, además, cuando se utilizan concentraciones bajas de biopolímero, los módulos viscoelásticos pueden ser muy bajos para dar una señal confiable en un reómetro convencional. No obstante, este tipo de determinaciones puede dar una aproximación del punto de gel (Lopes da Silva y Rao, 2007) y será usada en este trabajo.

Los estudios reológicos de soluciones acuosas de pectina se han enfocado hasta ahora en pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud en pectinas de bajo metoxilo de distintas fuentes. La mayor parte de los autores proponen que la gelificación de soluciones acuosas de pectina de bajo metoxilo en presencia de iones calcio, ocurre a temperaturas altas ($>60^{\circ}\text{C}$). Iglesias y Lozano, (2004) evaluaron la temperatura de transición sol-gel y las propiedades reológicas de geles de pectina de girasol (pectina de bajo grado de metoxilación) a través de pruebas de cizalla oscilatoria. Estos autores reportaron la formación de una red entrecruzada dependiente de la temperatura durante el enfriamiento de sus muestras desde 99 hasta 20°C . Observaron mucha inestabilidad en los datos de G' y G'' a temperaturas altas, tomando como criterio T_{gel} =temperatura en donde $\tan\delta=1$, observaron que T_{gel} se incrementa a medida que se incrementa la concentración de pectina. Por ejemplo determinaron para una muestra de 0.5% pectina de girasol con 0.025% Ca^{2+} y 30% azúcar, una $T_{\text{gel}}\approx 80^{\circ}\text{C}$ y para concentraciones de pectina de 1% $T_{\text{gel}}>90^{\circ}\text{C}$, lo cual dificultó la determinación de T_{gel} debido a que las soluciones se colocaban a temperaturas cercanas al punto

de ebullición. La Figura 12 muestra algunos de los resultados de Iglesias y Lozano (2004).

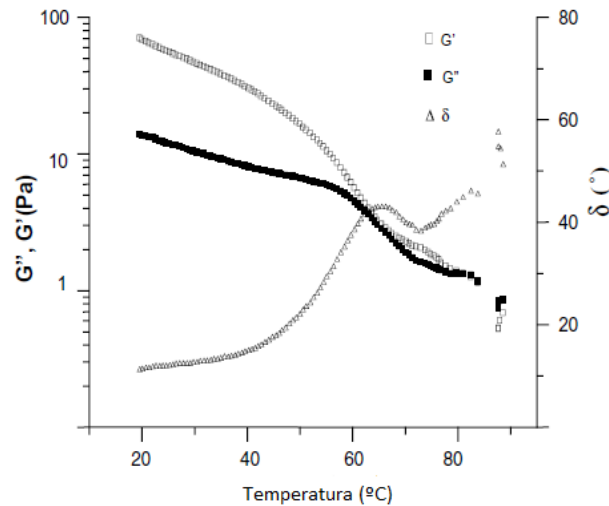


Figura 12. Evolución de los módulos dinámicos G' y G'' con la temperatura durante pruebas reológicas oscilatorias a frecuencia constante de 1 Hz, enfriando la muestra (3 °C/min) de pectina de girasol 0.5%, 30% azúcar, 25 mg $\text{Ca}^{2+}/\text{g}_{\text{pectina}}$, pH 2.7 (Iglesias y Lozano, 2004).

Los estudios reológicos de cizalla oscilatoria llevados a cabo hasta ahora en pectinas de bajo metoxilo coinciden en señalar que a medida que disminuye el grado de metoxilación de la pectina, su reactividad con calcio se incrementa y esto se refleja en temperaturas de gelificación elevadas, la cual ocurre prácticamente de forma simultánea con la adición de iones calcio a la solución de pectina (Iglesias y Lozano, 2004; Díaz-Rojas *et al.*, 2004; Cárdenas *et al.*, 2008; Gigli *et al.*, 2009). El mecanismo de gelificación propuesto para pectinas de bajo metoxilo es aquel que asume la consolidación de una red polimérica que involucra la asociación de “nudos” mediados por dos tipos de entrecruzamientos vía Ca^{2+} , principalmente son las estructuras cortas, diméricas llamadas comúnmente “cajas de huevo”, las cuales se forman a temperaturas altas acompañadas de un mecanismo altamente cooperativo. Además de estas zonas de unión cooperativas, se presume que se presentan interacciones iónicas menos específicas entre el

calcio y secuencias más cortas de residuos de ácido galacturónico no metoxilado, además de asociaciones entre dímeros para formar agregados. Se cree que estas asociaciones no cooperativas no contribuyen de forma importante en la fuerza y elasticidad del gel (Durand *et al.*, 1990; Braccini y Pérez, 2001; Díaz-Rojas *et al.*, 2004; Cárdenas *et al.*, 2008).

Los espectros mecánicos de pectinas de bajo metoxilo muestran un comportamiento tipo “gel débil” debido a la dependencia de G' con la frecuencia, principalmente a valores altos de frecuencia de oscilación, manteniéndose el predominio de G' sobre G'' . A medida que se incrementa el contenido de calcio disponible en la solución de pectina, los geles se fortalecen incrementando los módulos y disminuyendo la dependencia de éstos con la frecuencia (Cardoso *et al.*, 2003; Cárdenas *et al.*, 2008; Gigli *et al.*, 2009).

El fortalecimiento de los geles se presume que es debido al aumento de las interacciones entre iones calcio y cadenas de pectina (Díaz-Rojas *et al.*, 2004). En algunos otros estudios se reporta que debido a la competencia entre uniones cooperativas y no cooperativas para formar geles de pectina, se debe agregar una concentración mínima de iones calcio antes de llegar a una concentración crítica en la que ocurre la formación de geles. Para pectina de linaza la concentración crítica encontrada fue $R=0.233$, donde R es la relación estequiométrica: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. En geles de pectina de nopal valores de R de 0.07 a 0.21 generaron un incremento de G' en más de una orden de magnitud y a $G' \gg G''$, es decir a la creación de geles más rígidos y más elásticos (Figura 13). Posteriores incrementos en R hasta 0.42 sólo generaron incrementos moderados en G' (Cárdenas *et al.*, 2008). Estos resultados se interpretaron como la formación de geles más elásticos y densamente entrecruzados debido al incremento de zonas de unión vía puentes de calcio.

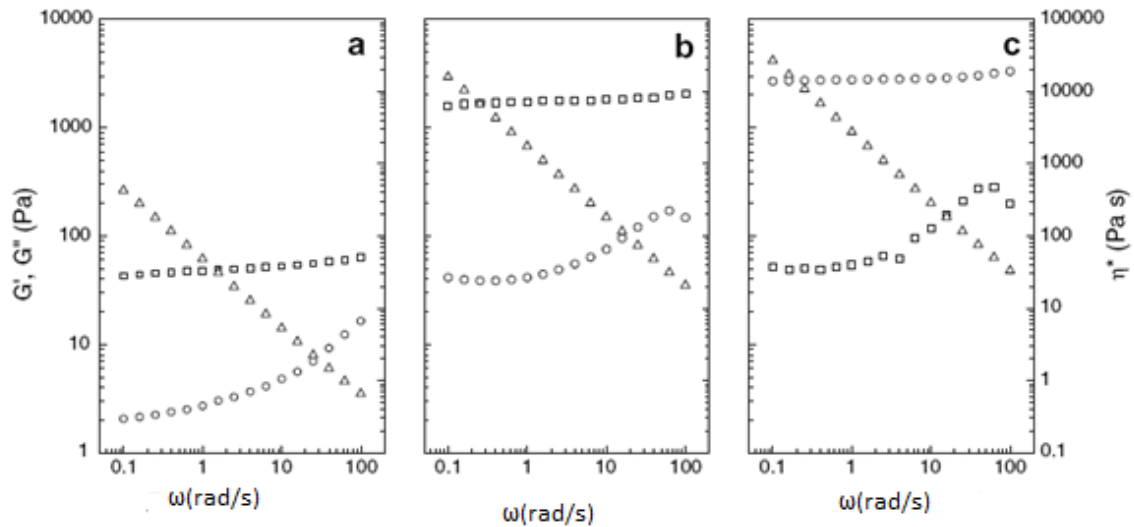


Figura 13. Variación de los módulos G' y G'' (ejes de la izquierda), y viscosidad compleja (eje derecha) en pruebas reológicas oscilatorias en geles de pectina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) al 1.6 %, 5°C, deformación 0.05, adicionados con CaCl_2 a tres niveles de la relación estequiométrica $R=2[\text{Ca}^{2+}]/[\text{COO}^-]$, a) 0.07, b) 0.21 y c) 0.42, los cuadrados representan G' , los círculos representan G'' , los triángulos representan η^* (Cárdenas *et al.*, 2008).

1.3.8 Polisacáridos pécticos de tuna

Investigaciones llevadas a cabo por el Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, han generado información acerca de las propiedades reológicas y rasgos químicos de polisacáridos pécticos extraídos de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.), variedad Alfajayucan;. En 2007, Lozada-Carbajal, reportó que en cáscara de tuna predominan polisacáridos pécticos, con comportamiento viscosificante y fluidificante al aplicar cizalla; se evidenció también la capacidad gelificante de soluciones acuosas de pectina al 2% (p/p) en presencia de calcio (5 mM CaCl_2), con espectros típicos de geles estables con la frecuencia de oscilación y con valores de módulos dinámicos superiores a los presentados por una pectina gelificante comercial (pectina de bajo metoxilo, Kelco).

Basándose en el trabajo anterior, Lira-Ortiz, 2009 perteneciente al mismo grupo de investigación, analizó el polisacárido extraído de cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan. A través de cromatografía de líquidos y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se determinó la composición en azúcares y se identificaron los grupos funcionales. El polisacárido extraído de la cáscara de tuna presentó 61.24% de ácido galacturónico, 15.40% de galactosa, 9.74% arabinosa, 4.2% ramnosa, 1.48% xilosa y 0.92% glucosa, con una distribución amplia de masas molares: 1320 kDa (30.6%), 318 kDa (38%), 33.7 kDa (19.4%) y 4.2 kDa (12.1%). Los análisis de FTIR confirmaron la presencia de un polímero con los rasgos estructurales típicos de pectinas, estimándose en el polisacárido un grado de metoxilación cercano al 30%. Las propiedades reológicas al flujo demostraron que dispersiones acuosas (0.5, 1 y 2% p/p) del polisacárido obtenido de la cáscara de tuna presentan índices de consistencia (K : 0.01-1.56 Pa sⁿ) y de pseudoplasticidad (n : 0.92-0.6) superiores a pectinas cítricas comerciales líderes en el mercado de estabilizantes alimentarios.

Capítulo 2

Justificación, Hipótesis y Objetivos

2.1 Justificación

La necesidad de contar con biopolímeros con propiedades funcionales específicas para su uso en alimentos ha llevado a la modificación de la estructura química de estas macromoléculas y al estudio de nuevos biopolímeros con propiedades reológicas innovadoras. Una alternativa ha sido la búsqueda de pectinas en nuevas fuentes, aprovechando la aceptación que ha tenido este polisacárido por su origen vegetal. Actualmente, la industria mundial de extracción de pectinas está soportada en los desechos de cítricos y pomáceos. No obstante, nuevas fuentes de pectinas pueden ser atractivas desde el punto de vista económico, tal es el caso de la cáscara de tuna considerando la producción de tuna en nuestro país, el desperdicio de frutos en época de cosecha y la nula existencia de tecnologías para el aprovechamiento de sus cáscaras.

En estudios previos realizados dentro del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria (Lozada-Carbajal, 2007, Lira-Ortiz 2008) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, se estandarizó un proceso de extracción de pectinas a partir de cáscaras de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan, obteniéndose rendimientos entre 9 y 18% en base seca. El polisacárido extraído fue analizado en su contenido de azúcares, ácido galacturónico, masa molar y determinación de grupos funcionales a través de cromatografía de líquidos y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.

Estos estudios confirmaron la presencia de un polímero con los rasgos estructurales típicos de pectinas, con un grado de metoxilación ~30%. Las soluciones acuosas de este polisacárido presentaron comportamientos reológicos no newtonianos, con índices de consistencia y de pseudoplasticidad superiores a algunas pectinas cítricas comerciales. El bajo índice de metoxilación y observaciones cualitativas han mostrado que los polisacáridos extraídos de la cáscara de tuna gelifican en presencia de calcio. Sin embargo, no se han realizado

hasta ahora estudios reológicos dinámicos para evaluar estas propiedades. Por lo tanto, se considera relevante llevar a cabo estudios reológicos para determinar las propiedades gelificantes de la pectina extraída de la cáscara de tuna con la finalidad de caracterizarla y proponerla como un aditivo alimentario.

2.2 Hipótesis

Los polisacáridos pécticos extraídos de la cáscara de tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan, gelificarán cooperativamente en presencia de calcio, generando geles con propiedades elásticas predominantes a medida que se incrementa la fuerza iónica presente en el medio.

2.3 Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Determinar las propiedades viscoelásticas de pectinas de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) a través de pruebas reológicas de cizalla oscilatoria, con la finalidad de generar conocimiento acerca de la funcionalidad de este biopolímero en medio acuoso y sugerir su uso como aditivo alimentario.

2.3.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la relación estequiométrica $[2\text{Ca}^{++}]/[\text{COO}^-]$ en la temperatura de transición sol-gel de soluciones acuosas de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan, a través de la evolución de los módulos viscoelásticos, G' , G'' , en función de la temperatura.

- Determinar las propiedades viscoelásticas de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan, en función de la relación estequiométrica $[2\text{Ca}^{++}]/[\text{COO}^-]$ a través de pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud.

- Discutir la relación estructura química-propiedades reológicas del polisacárido péctico de tuna a través de la Identificación del perfil químico del polisacárido (grupos funcionales, estimación del grado de metoxilación, distribución de masas molares).

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1 Materiales

Se utilizó tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan (Figura 14) obtenidas de la Central de Abastos de la ciudad de Tulancingo de Bravo, Estado de Hidalgo. Las tunas se obtuvieron en periodo mayo-octubre 2009, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo al índice de madurez. Las cáscaras utilizadas para este estudio fueron del índice de madurez comercial (Figura 14).



Figura 14. Tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan usada en este trabajo

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción de pectina

La cáscara de la tuna se separó del fruto y se trituroó con un procesador de alimentos doméstico (Oster, modelo 3212-12) para obtener un tamaño de partícula que permitiera mayor área de contacto cáscara-medio durante el proceso de extracción. Con la finalidad de inactivar enzimas, se realizó un escalde o blanqueamiento colocando la cáscara de tuna previamente triturada en un lienzo de tela de organza sobre un baño de agua a ebullición por espacio de 5 minutos. La extracción de los polisacáridos no celulósicos presentes en la cáscara de tuna,

se efectuó en medio acuoso, mediante procesos discontinuos a nivel tanque agitado de 5 L con un volumen de operación de 3 L (Figura 15).



Figura 15. Montaje experimental del proceso de extracción de polisacáridos pécticos de tuna. Tanque agitado enchaquetado acoplado a un agitador Lightning® con control de agitación y sonda de temperatura.

Las extracciones se realizaron manejando una relación cáscara húmeda/medio acuoso de 30 g/100 mL, utilizando agua desionizada durante todo el proceso. Se llevó a cabo un proceso de extracción fraccionada, siguiendo la metodología de Lozada-Carbajal (2007) con la finalidad de eliminar mucílagos (etapa 1), polisacáridos solubles en agua (etapa 2) y obtener polisacáridos pécticos solubles en soluciones acuosas de agentes quelantes (etapa 3). La primera etapa de extracción se realizó a temperatura ambiente (25 °C) durante 2 horas con 550 rpm de agitación y sin control de pH. Concluido el tiempo de esta etapa, las cáscaras en suspensión se separaron desechando el extracto, éstas fueron re-suspendidas en agua desionizada a 60 °C durante 2 horas, 550 rpm y sin control de pH, realizando así la segunda etapa de la extracción, eliminando en ésta polisacáridos solubles en agua caliente. En la tercera etapa las cáscaras se suspendieron en una solución acuosa de la sal disódica del ácido etilendinitrilo tetracético (EDTA) con una concentración de 0.5% (p/v) a 70 °C durante 2 horas a 550 rpm. El residuo agotado se separó de la solución acuosa filtrando a través de un lienzo de organza, el polisacárido extraído se recuperó del medio de extracción utilizando

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

etanol frío al 96 % v/v (grado industrial) en una relación 1:1.5 extracto filtrado-etanol. El polisacárido precipitado se separó de la solución acuosa filtrando con tela de organza en 3 capas, obteniendo un polímero de apariencia esponjosa.

3.2.2 Purificación de la pectina extraída

El polisacárido obtenido se re-suspendió en agua desionizada, manteniendo agitación constante para disolver el exceso de sales provenientes de la extracción. El polisacárido disuelto se precipitó con etanol frío al 96% v/v, utilizando la misma relación extracto-etanol. De forma manual se eliminó el exceso de alcohol-agua y posteriormente se redisolvió nuevamente el polímero en agua desionizada. Una vez concluida la hidratación del polímero, se colocó la solución polimérica en membranas de diálisis de 12 kDa de corte molecular, las cuales fueron tratadas previamente con agua desionizada. La solución se dializó contra agua desionizada, manteniendo las membranas de diálisis en agitación (Figura 16) durante 48 horas, cambiando el agua por lo menos cada 8 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se separó por decantación una fracción insoluble de polímero depositada en el fondo de las membranas. El polímero soluble se recuperó con etanol frío. Posteriormente se llevó a cabo un proceso de secado a 40-45°C durante 24 horas en una estufa de secado convectivo (Shell Lab, 1380SX), para finalmente pulverizar el polímero en un mortero de laboratorio.

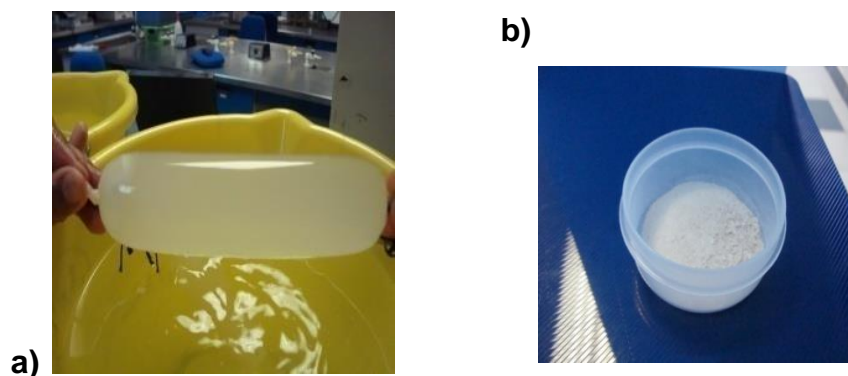


Figura 16. a) Solución de pectina dentro de las membranas de diálisis b) Pectina seca y pulverizada.

3.2.3 Determinación del rendimiento de pectina extraída

El rendimiento (R) de las extracciones de pectina se calculó utilizando la ecuación 3.2-1.

$$R = \frac{\text{sólidos secos extraídos y precipitados con etanol (g)}}{\text{sólidos secos totales de la cáscara de tuna (g)}} \quad (\text{Ec. 3.2-1})$$

3.2.4 Caracterización fisicoquímica

La pectina extraída de la cáscara de tuna se sometió a los siguientes análisis:

a) Determinación de humedad

Para la determinación de humedad se pesaron por triplicado 0.1 g de polisacárido en un crisol de porcelana, previamente colocado a peso constante. Las muestras se secaron a 100 °C hasta peso constante en una estufa Shel Lab, modelo 1380FX. El porcentaje de humedad se calculó usando la ecuación 3.2-2.

$$\text{Humedad (\%p/p)} = \frac{(C_{mh} - C_{ms})}{m} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.2-2})$$

Donde:

C_{mh} = masa de la cápsula con muestra húmeda (g)

C_{ms} = masa de la cápsula con muestra seca (g)

m = masa de la muestra (g)

b) Determinación de cenizas

Se calcinaron 0.1 g de polisacárido libre de humedad en una mufla (Lunderberg/Blue No. Serie BH51700) a 550 °C durante 5 h. La determinación del contenido de cenizas se realizó por triplicado utilizando la ecuación 3.3-3.

$$\text{Cenizas (\%p/p)} = \frac{(C_o - C)}{m} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.3-3})$$

Donde:

C_o = masa del crisol con muestra calcinada (g)

C = masa del crisol seco (g)

m = masa de la muestra seca (g)

c) Determinación de proteína

El contenido de proteína en la pectina extraída se determinó mediante el método Kjendahl (AOAC, 1998), usando 0.1 g de muestra seca. El porcentaje de nitrógeno se calculó usando la ecuación 3.3-4 y se usó como factor 6.25 para convertir el

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

nitrógeno total a contenido de proteína. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Nitrógeno (\%p/p)} = \frac{(V-V_0)(N_{H_2SO_4})(meq_N)}{m} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.3-4})$$

Donde:

V = volumen de H₂SO₄ gastados en la titulación de la muestra (mL)

V₀ = volumen H₂SO₄ gastados en la titulación del blanco (mL)

NH₂SO₄ = normalidad de H₂SO₄ (miliequivalentes/mL)

meq_N = peso equivalente del nitrógeno (g/miliequivalentes) = 0.014

m = masa de la muestra (g)

3.2.5 Determinación de la distribución de masas moleculares

La distribución de masas moleculares de las fracciones de biopolímeros presentes en la pectina de cáscara de tuna se realizó por cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel o tamiz molecular), acoplada a un detector de índice de refracción (HPLC-IR), en la Central Analítica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Zacatenco (estudios realizados a través de la colaboración de la Q. Elvira Ríos Leal). Para este estudio, se usó un gramo de polímero seco extraído de la cáscara de tuna, al cual se le adicionaron 20 mL de isopropanol para purificarlo, la mezcla se sonicó durante 20 min a 24°C y se centrifugó. La fase líquida se decantó y el disolvente se eliminó por evaporación. De la muestra seca se pesaron 10 mg, los cuales se aforaron a 10 mL con agua destilada. La muestra se filtró usando una membrana de 0.22 μm de tamaño de poro. Para el análisis cromatográfico se utilizaron las siguientes condiciones:

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

Cuadro 2. Condiciones cromatográficas para la determinación de distribución de masas moleculares en pectina extraída de la cáscara de tuna.

Columna	TSK gel 5000PWXL 7.8 mm DI x 30 cm
Fase móvil	H ₂ O
Temperatura de la columna	65 °C
Flujo	0.6 mL/min

3.2.6 Determinación de azúcares totales

a) Hidrólisis ácida de pectina

Se pesaron 20-25 mg de pectina a los cuales se le adicionó 500 µL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se mantuvo en agitación cada 10 minutos durante 1 h, usando un agitador de tubo tipo vórtex. Posteriormente se adicionaron 10 mL de agua y la mezcla se llevó a autoclave a 121°C durante 1 h. Las soluciones se enfriaron y se aforaron a 50 mL con agua (soluciones de pectina hidrolizada).

b) Determinación de azúcares totales

Para la determinación de azúcares totales se usó la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) usando pectina hidrolizada. En tubos de ensayo etiquetados se colocó 1 mL de la solución acuosa de pectina hidrolizada y 1 mL de fenol al 5% (p/v). Inmediatamente después se adicionaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. La adición fue rápida y directa a la superficie del líquido. Los tubos se mezclaron perfectamente utilizando un agitador de tubos (Vórtex), se enfriaron a temperatura ambiente y se determinó la intensidad del color naranja obtenido por medio de un espectrofotómetro (Jenway, 6715 Uv/Vis. Spectrophotometer) a

485 nm, frente a un blanco de reactivos usando agua destilada como muestra. Para calcular la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra se preparó una curva patrón con soluciones diluidas de glucosa, la cual se muestra en la Figura 17.

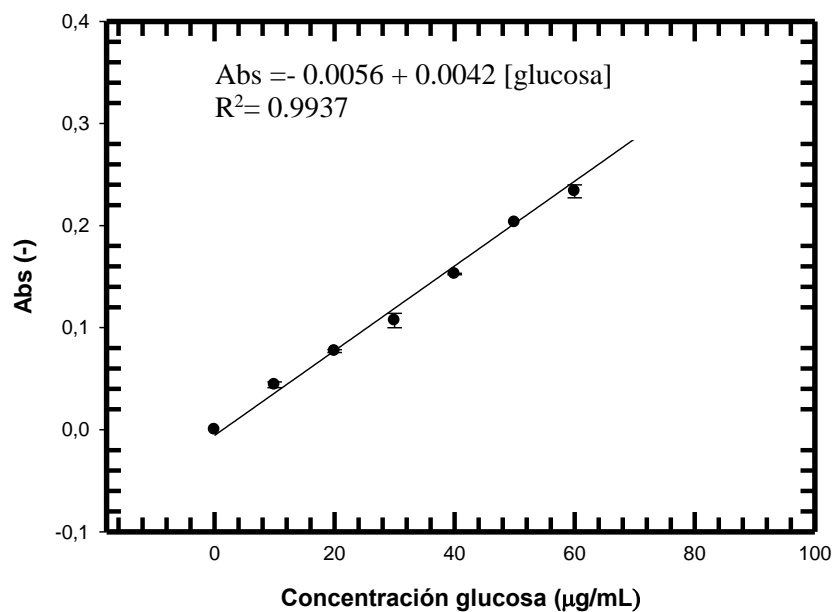


Figura 17. Curva de calibración para cuantificación de azúcares totales por el método de Fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

3.2.8 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

Se realizó un análisis de espectroscopia de infrarrojo en la pectina de cáscara de tuna con la finalidad de identificar los grupos funcionales presentes en la molécula y establecer similitudes entre esta pectina, la pectina estudiada por Lira-Ortiz (2009) y pectinas cítricas comerciales con grado de metoxilación conocido. Los análisis se realizaron en un equipo de Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR Spectrum GX, Perkin Elmer) equipado con un accesorio reflectante total (ATR, Sentir Technologies) en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo Coahuila México

(estudio llevado a cabo a través de la colaboración del Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel).

La muestra de pectina en polvo fue analizada por espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR, Spectrum GX Perkin Elmer) y acondicionando con un reflector Golden-gate atenuado con accesorio reflectante total (ATR). Los espectros fueron registrados por 35 escaneos a una resolución de 4.0 cm^{-1} . Las lecturas espectroscópicas se realizaron a una resolución de 4000 a 650 cm^{-1} . En el programa Spectrum, Molecular Spectroscopy Versión 3.02.01, Perkin Elmer, Inc. (Estados Unidos de América). Los espectros fueron corregidos a una línea base y normalizados a absorbancia de 1.

3.2.9 Preparación de soluciones y geles de pectina

La pectina se dispersó en agua desionizada a temperatura ambiente ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$), usando una parrilla eléctrica con agitación magnética, adicionándola lentamente en el vórtice del disolvente, evitando la formación de grumos; la agitación continuó hasta completar la dispersión (aproximadamente 12 h). Posteriormente, la temperatura de la muestra se incrementó a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ donde se adicionó el volumen de una solución *stock* de CaCl_2 (60 mM), previamente calentada a $85\text{-}90 \text{ }^\circ\text{C}$. Este volumen se determinó a través de un balance de masa para generar soluciones de pectina con distintas relaciones estequiométricas, $R=2[\text{Ca}^{2+}]/[\text{COO}^-]$, como se muestra en el Cuadro 3. Para estos cálculos se consideró el contenido de ácido galacturónico reportado por Lira-Ortiz (2009) en pectinas de cáscara de tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan. Las muestras recién preparadas y aún calientes ($85\text{-}95^\circ\text{C}$) se colocaron en la geometría del equipo de reometría para su caracterización.

Cuadro 3. Matriz de experimentos para examinar el efecto de la concentración de calcio en las propiedades reológicas de soluciones de pectina al 0.4 % (p/p). R es la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$.

R ($2[Ca^{2+}]/[COO^-]$)	Concentración CaCl ₂ (mM)
1.33	3.075
1.25	2.883
1.18	2.713
1.11	2.563
1.05	2.428
1.00	2.306
0.33	0.756
0.22	0.506
0.11	0.259
0	0

3.2.10 Determinaciones reológicas

Se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud a 25 °C en soluciones de pectina al 0.4%(p/p), usando un reómetro de esfuerzo controlado marca TA INSTRUMENTS, modelo AR2000 (Figura 18). En las determinaciones se usó la geometría de cilindros concéntricos de doble pared (espacio anular interno: 0.19 mm, espacio anular externo: 0.415 mm y longitud del cilindro 59.50 mm). Las muestras fueron colocadas calientes (85-95 °C) en la geometría del equipo, previamente calentada a 90 °C.

La caracterización reológica de los geles o soluciones de pectina consistió en la utilización de diferentes pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud:

- 1) Se realizó un barrido de temperatura de los módulos dinámicos (G' , G'') de 90 °C a 25 °C, a una frecuencia de 1 rad/s, con el objetivo de promover la gelificación, si las condiciones iónicas lo permiten, y obtener una aproximación al intervalo de temperatura en el cual ocurre la transición sol-gel ($T_{sol-gel}$). Como variable impuesta se usó la torca para las soluciones con baja concentración

de CaCl_2 mientras que para las soluciones con más concentración de CaCl_2 se controló la deformación. La variable de control fue modificándose de acuerdo a la señal del equipo manteniendo señales de torca estables y deformaciones dentro de la zona de viscoelasticidad lineal de las muestras.

- 2) Concluido el barrido de temperatura, se determinó la evolución de los módulos dinámicos (G' , G'') y de $\tan \delta$ a través del tiempo, a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y 1 rad/s de frecuencia hasta alcanzar el estado estacionario en los módulos o hasta 11 h.
- 3) Posteriormente, se realizó el barrido de frecuencia de 0.1 a 100 rad/s a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (espectro mecánico dinámico), usando como variable impuesta la torca y considerando la respuesta de la muestra (deformación obtenida) en la evolución de los módulos con el tiempo (prueba previa).
- 4) Finalmente se realizó un barrido de deformación usando como variable de control la torca (10 a $10000\text{ }\mu\text{Nm}$) para verificar si las determinaciones anteriores se realizaron dentro de la zona de viscoelasticidad lineal (ZVL). De no ser así, las determinaciones se repitieron con una nueva muestra.



Figura 18. Reómetro de esfuerzo controlado TA Instruments AR2000 y geometría de cilindros concéntricos de doble pared usados en esta investigación.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1 Análisis proximal

El rendimiento de extracción de pectina de cáscara de tuna, *Opuntia albicarpa* S. variedad Alfajayucan (Gallegos-Vázquez *et al.*, 2005), fue de 9.12%, similar al obtenido por Lira-Ortiz, 2009 (9.8%±0.56) usando condiciones similares de extracción y la misma variedad de tuna. En ambos trabajos se incluyen lavados con etanol y un proceso de diálisis (usando una membrana de celulosa de corte molecular de 12 kDa), lo cual reduce el rendimiento de extracción pero mejora la pureza del polisacárido. Otros autores (Cuadro 4) han reportado rendimientos de extracción de polisacáridos pécticos de tuna *Opuntia ficus-indica* L. M. del mismo orden de magnitud, usando procesos de extracción en medio acuoso (Majdoub *et al.*, 2001a; Habibi *et al.*, 2004a) o extracción ácida-alcohólica (Majdoub *et al.*, 2001b).

Cuadro 4. Valores de rendimiento obtenidos durante la extracción por lote de polisacáridos pécticos extraídos de la cáscara de tuna de distintas variedades.

Tuna	Condiciones de extracción	Tiempo de extracción (h)	Rendimiento (% p/p) en base seca	Referencia
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Ácida	NR	0.12	Forni <i>et al.</i> , 1994
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Acuosa a temperatura ambiente	48	7.3	Majdoub <i>et al.</i> , 2001a
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Acida/Alcohólica (pH=2, 80°C)	2	7.0	Majdoub <i>et al.</i> , 2001b
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Acuosa con agentes quelantes (60°C)	2 (2 veces)	12.4	Habibi <i>et al.</i> , 2004a
<i>Opuntia albicarpa</i> S.	Acuosa con agentes quelantes (1.0% EDTA, 70°C)	2	7.6 ±1.6	Lozada Carbajal, 2007
<i>Opuntia albicarpa</i> S.	Acuosa con agentes quelantes (1.0% EDTA, 70°C)	2	9.8%±0.56	Lira-Ortiz, 2009
<i>Opuntia albicarpa</i> S.	Acuosa con agentes quelantes (0.5% EDTA, 70°C)	2	9.12%±0.14	Presente trabajo

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

En el Cuadro 5 se muestran los resultados del análisis proximal realizado al polisacárido péctico de tuna y se compara con los resultados obtenidos por Lozada-Carbajal (2007) y Lira-Ortiz (2009), quienes extrajeron polisacáridos pécticos de la cáscara de tuna de la misma variedad a la usada en este trabajo y con condiciones similares de extracción. En el Cuadro 5 se observan que el contenido de cenizas es sustancialmente más bajo que el que obtuvo Lira-Ortiz (2009) y Lozada-Carbajal (2007), lo cual se debe posiblemente al uso de una concentración menor de agente secuestrante de calcio (EDTA 0.5%) y al proceso de diálisis, el cual se realizó con cambios más frecuentes del agua de diálisis, generando un mayor gradiente de concentración entre la solución polimérica y el agua desionizada, consecuentemente la remoción de sales del polímero fue más eficiente y aparentemente el EDTA no estuvo en exceso.

Cuadro 5. Análisis proximal de la composición química de la pectina obtenida a partir de cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.). Se muestran los datos promedio ($n=3$) \pm su desviación estándar.

	Humedad (% p/p)	Proteína (% p/p_{b.s.})	Cenizas (% p/p_{b.s.})	Azúcares totales (% p/p_{b.s.})
Lozada-Carbajal, 2007 (Extracción acuosa con 1.0% EDTA, 70°C, 2 h)	3.42 \pm 0.07	0.11 \pm 0.01	19.35 \pm 0.93	NR
Lira-Ortiz, 2009 (Extracción acuosa con 1.0% EDTA, 70°C, 2 h)	10.89 \pm 0.12	0.30 \pm 0.01	9.80 \pm 0.92	NR
Presente trabajo (Extracción acuosa con 0.5% EDTA, 70°C, 2 h)	9.66 \pm 1.15	1.83 \pm 0.28	0.022 \pm 0.003	73.62 \pm 2.02

*b.s.: base seca

Por otra parte, es notable la presencia de proteína o péptidos en el polisacárido obtenido en este trabajo (1.83%). Cualitativamente fue notable que el polisacárido no dializado generara soluciones acuosas espumosas, mientras que una vez dializado la espuma en éstas disminuyó. Estas observaciones generaron la

inquietud de evaluar sus propiedades de superficie, para lo cual se realizó una estancia de investigación en Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos del Departamento de Ingeniería y Tecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los estudios preliminares de tensión superficial indicaron que el polisacárido péctico extraído de la cascara de tuna tiene propiedades de superficie similares a las encontradas en goma acacia y pectinas de remolacha, esta últimas atribuidas a la formación de complejos proteína-pectina, alto contenido de esteres de acetilo y ácido ferúlico principalmente (Kirby *et al.*, 2006; Yapo *et al.*, 2007; Nakauma *et al.*, 2007; Drusch, 2006; Kiong *et al.*, 2008; Gromer *et al.*, 2009). Estas propiedades serán evaluadas con mayor detalle en posteriores proyectos de investigación por lo que no se presentan en este trabajo.

En el 2009, Lira-Ortiz, reportó el análisis del contenido de azúcares neutros y ácido galacturónico del polisacárido péctico extraído de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.). El presente trabajo se considera complementario al de Lira-Ortiz, por lo que la composición de azúcares y de ácido galacturónico del polisacárido obtenido en este trabajo es cercana al reportado por Lira-Ortiz, la cual se muestra en el Cuadro 6 y se compara con los datos de otros polisacáridos pécticos extraídos de cáscaras de tuna. La concentración de ácido galacturónico del polisacárido péctico sometido a proceso de diálisis es similar a la reportada por Forni *et al.*, (1994) y Habibi *et al.*, (2004a), y cumple con el mínimo de ácido galacturónico (65%) establecido por el Codex Alimentario y la FAO para ser considerado como “pectina”. Esto es importante, ya que frecuentemente se considera que las cactáceas contienen sólo mucílagos (polisacáridos solubles en agua, no gelificantes), los cuales se diferencian de las pectinas por estar compuestos básicamente de azúcares neutros formando estructuras muy ramificadas. El contenido relativamente alto de ramnosa en el polisacárido péctico

de *Opuntia albicarpa* S., sugiere un número importante de ramificaciones en el esqueleto principal del ramnogalacturonano I (ver sección 1.3.1), estas ramificaciones pudiesen ser grandes en extensión y compuestas principalmente por arabinosa y galactosa.

Cuadro 6. Contenido de azúcares neutros y ácido galacturónico en polisacáridos pécticos extraídos de cáscara de tuna. Datos expresados en % peso/peso en base seca.

Glu	Xil	Ram	Gal	Ara	Ácido galacturónico	Fruto	Referencia
3.9	3.3	-*	34.5*	9.0	64.3	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Forni <i>et al.</i> , 1994 ^a
0	0	48.2	0	0	51.8	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Madjoub <i>et al.</i> , 2001b ^b
0	0	46.9	0	0	53.1	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Majdoub <i>et al.</i> , 2001a ^c
1.50	4.50	4.20	23.5	32.7	14.2	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Habibi <i>et al.</i> , 2004b ^d
3.30	0.90	3.70	4.0	17.20	64.5	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Habibi <i>et al.</i> , 2004a ^e
12.50	0.80	12.50	10.80	1.20	50.70	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Habibi <i>et al.</i> , 2005 ^f
-	26.88	18.27	44.08	10.75	23.40	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Matsuhiro <i>et al.</i> , 2005 ^g
0.92	1.48	4.20	15.40	9.74	61.24	<i>Opuntia albicarpa</i> S.	Lira-Ortiz, 2009 ^h
0.12	NR	2.16	19.50	0.12	65.42	<i>Opuntia albicarpa</i> S.	Lira-Ortiz, 2009 ⁱ

Glu: glucosa

Xil: xilosa

Ram: ramnosa

Gal: galactosa

Ara: arabinosa

*Forni *et al.*, (1994) reporta la suma de ramnosa y galactosa.

^a: Extracción ácida (HCl pH=2.0, 80 °C).

^b: Extracción acuosa a temperatura ambiente.

^c: Extracción alcalina (pH 7.0-7.5) con agentes quelantes (hexametáfosfato de sodio).

^d: Acuosa 20°C.

^e: Extracción con agente quelante (EDTA 0.5%) en solución acuosa (60 °C).

^f: Extracción ácida fraccionada en 3 etapas.

^g: Extracción acuosa.

^h: Extracción con agente quelante (EDTA 1%) en solución acuosa a 70 °C.

ⁱ: Extracción con agente quelante (EDTA 1%) en solución acuosa a 70 °C. Polisacárido dializado (corte molecular 10 kDa).

4.2 Distribución de masas moleculares de la pectina obtenida de cáscara de tuna

La determinación de las masas moleculares en pectinas, es relativamente difícil debido a la heterogeneidad de su composición, la solubilidad en agua y la agregación de moléculas de pectina. Los valores de masa molar de pectinas usualmente oscilan entre 10 y hasta cientos de kilodaltones (kDa), estos valores dependen del tipo de extracción usada y de la fuente de pectina (Aguilera y Stanley, 1999). En el Cuadro 7 se presentan la distribución de las masas moleculares de las fracciones que forman la pectina obtenida a partir de cáscara de tuna. El polisacárido está compuesto por fracciones de masas moleculares altas, desde 1556 kDa hasta 599 kDa; resultados muy parecidos a los que reportó Lira-Ortiz en el 2009 para el polisacárido obtenido de cáscara de tuna de la misma variedad y usando condiciones similares de extracción; lo que hace suponer que los resultados del presente trabajo representan una réplica del trabajo anteriormente mencionado debido a que las distribuciones se encuentran dentro del mismo orden de magnitud.

Cuadro 7. Distribución de las masas moleculares en la pectina de cáscara de tuna mediante cromatografía de líquidos de tamiz molecular.

		Masa molecular (kDa)	%
	Polisacárido sin dializar	1320.00	30.57
		318.00	37.91
		33.7	19.44
		4.2	12.08
Lira-Ortiz, 2009	Polisacárido dializado (corte molecular 10 kDa)	1629.39	79.30
		707.91	11.16
		576.33	9.56
Presente trabajo	Pectina dializada	1556.00	42.03
		996.93	33.79
		777.72	2.60
		599.17	21.55

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

Por lo tanto la pectina de tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.) está construida fundamentalmente por 3 fracciones de polisacáridos, cuyas masas molares rebasan el medio millón de daltones. Esto es congruente con las viscosidades altas de sus soluciones; por ejemplo, soluciones acuosas al 2% de pectina de tuna muestran un comportamiento pseudoplástico con $K=1.6 \text{ Pas}^{0.59}$ y $n=0.59$ (Lira-Ortiz, 2009).

Algunos polisacáridos viscosificantes como goma guar, goma de algarrobo y goma karaya tienen masas molares en el orden de 300 a 950 kDa (Lapasin y Pricl, 1995). Para pectinas cítricas de bajo metoxilo, las cuales presentan comportamientos newtonianos, se han reportado masas molares desde 226-230 kDa (Yoo *et al.*, 2006; Gigli *et al.*, 2009) hasta 513 kDa (Cardoso *et al.*, 2003). Pocos estudios de caracterización macromolecular se han llevado a cabo con pectinas de tuna, sólo se conoce el estudio realizado por Majdoub *et al.*, (2001a), quienes reportaron masas molares de 2.25×10^5 y 2.40×10^5 Da de polisacáridos pécticos extraídos de la cáscara de tuna (*Opuntia ficus-indica*) mediante extracción acuosa y ácido-alcohólica, respectivamente. Las masas molares de las fracciones de la pectina de tuna tienen una magnitud similar a la reportada para goma xantana (Lapasin y Pricl, 1995), polisacárido ramificado, aniónico y cuyas soluciones acuosas presentan un comportamiento al flujo del tipo pseudoplástico.

4.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

a) Comparación de estructura y grupos funcionales de la pectina obtenida a partir de cascara de tuna y ácido poligalacturónico.

La espectrometría en el infrarrojo es una herramienta versátil que se aplica a la determinación cuantitativa y cualitativa de especies moleculares de todo tipo. Sus aplicaciones se dividen en relación con las regiones espectrales del infrarrojo. La región más utilizada es la del infrarrojo medio que se extiende entre aproximadamente 670 y 2000 cm^{-1} . La región en el infrarrojo medio se usó en el

presente trabajo para determinar los grupos funcionales presentes en la pectina extraída de cáscara de tuna, comparando el espectro obtenido con aquéllos de pectinas estándares (i.e. pectinas cítricas con grados de metoxilación conocidos).

La identificación de los grupos funcionales del polisacárido tipo pectina de cáscara de tuna se realizó en la región de radiación infrarrojo de 2000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} . En la Figura 19 se presenta el espectro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) de ácido poligalacturónico (APG), pectina de cáscara de tuna obtenida por Lira-Ortiz (2009) y pectina de cáscara de tuna de este trabajo. En la región de $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ se presenta el patrón característico de los azúcares estructurales presentes en pectinas, a esta región se le denomina “la huella digital”. La mayoría de los enlaces sencillos originan bandas de absorción en esta región y éstas dependen de la estructura del esqueleto completo de la molécula.

En el caso de las pectinas, la región de 1200 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} está dominada por vibraciones de tensión de enlaces C-OH, C-O-C y C-C en azúcares neutros. En trabajos realizados por Kačuráková *et al.*, (2000) se reportan 2 bandas fuertes características de pectinas a 1100 y 1017 cm^{-1} ; las cuales están presentes tanto en la pectina de tuna estudiada por Lira-Ortiz (2009) como la de este trabajo. En esta última, la banda en la región de 1100 presenta el pico máximo en 1090 cm^{-1} y se presenta un pico ancho con un máximo en 1011 cm^{-1} .

Los picos de absorción en 1048 y 1073 cm^{-1} ; los cuales son más intensos en la pectina de este trabajo, comparados con la pectina estudiada por Lira-Ortiz, se asume corresponden a ramnogalacturanos y β -galactanos, los cuales presentan bandas de absorción máximas en 1070 y 1043 cm^{-1} (ramnogalacturanos) y 1072 cm^{-1} , respectivamente (Kačuráková *et al.*, 2000).

El pico en 1143 cm^{-1} es característico de enlaces C-OH, C-O-C y C-C de pectinas. Por lo tanto, a través de este estudio se determina la naturaleza péctica del polisacárido extraído de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.). En la región de los $1000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ se identifican los principales grupos químicos presentes en pectinas, lo que permite comparar estructuralmente las distintas muestras. La región que comprende 1800 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} es específica para la absorción infrarrojo de grupos carboxilos libres y esterificados, por lo tanto permite estimar el grado de metoxilación de las pectinas (Chatjigakis *et al.*, 1998).

El pico ancho en la región de 1780 a 1700 cm^{-1} se presume como el resultado de la absorción de los grupos carboxilo metoxilados (COOCH_3), los cuales se han reportado en 1750 cm^{-1} (Contreras-Esquivel *et al.*, 2007). Sin embargo, en polisacáridos con grupos éster, la banda de tensión del grupo C-O-C, sufre desplazamientos hacia frecuencias mayores por efecto de la asociación por enlaces de hidrógeno (Contreras-Esquivel *et al.*, 2007). La tensión de los enlaces C=O y C-O de ácidos carboxílicos se presenta en longitudes de onda de 1600 cm^{-1} y 1414 cm^{-1} , respectivamente (McCann y Roberts, 1991; Thygesen *et al.*, 2003), la señal en esas longitudes de onda indican una mayor proporción de pectina no esterificada.

Por lo tanto, los picos observados en 1607 cm^{-1} y 1414 cm^{-1} representan la cantidad de ácidos urónicos no esterificados en la muestra, la cual tiene una menor proporción en comparación con la que contiene el polisacárido de Lira-Ortiz (2009) y el ácido poligalacturónico (APG). En pectinas cítricas, la vibración en 1615 cm^{-1} corresponde principalmente a la presencia del grupo carboxílico del ácido galacturónico, en el caso de la pectina de cáscara de tuna del presente trabajo se observa una pequeña diferencia en el ancho del pico; debida

posiblemente a la presencia de grupos acetilo en la molécula de ácido galacturónico, lo que genera un efecto aditivo de este grupo en la misma región.

La región de los grupos carbonilo se encuentra presente en la región de 1320 cm^{-1} (Monsoor *et al.*, 2001), es evidente el mayor contenido de moléculas con este grupo funcional en la pectina estudiada en este trabajo. La ligera diferencia en la intensidad del pico en 1607 cm^{-1} , con respecto al APG y a la pectina de cáscara de tuna de Lira-Ortiz, se presume se debe a la presencia de restos de ácido ferúlico en pectinas de cáscara de tuna, el cual por poseer un anillo aromático debiera presentar picos de absorción en la región de 1618 cm^{-1} a 1583 cm^{-1} . El ácido ferúlico se ha reportado en pectinas de espinaca, remolacha (Thibaut y Rinaudo 1986; Synytsya *et al.*, 2003).

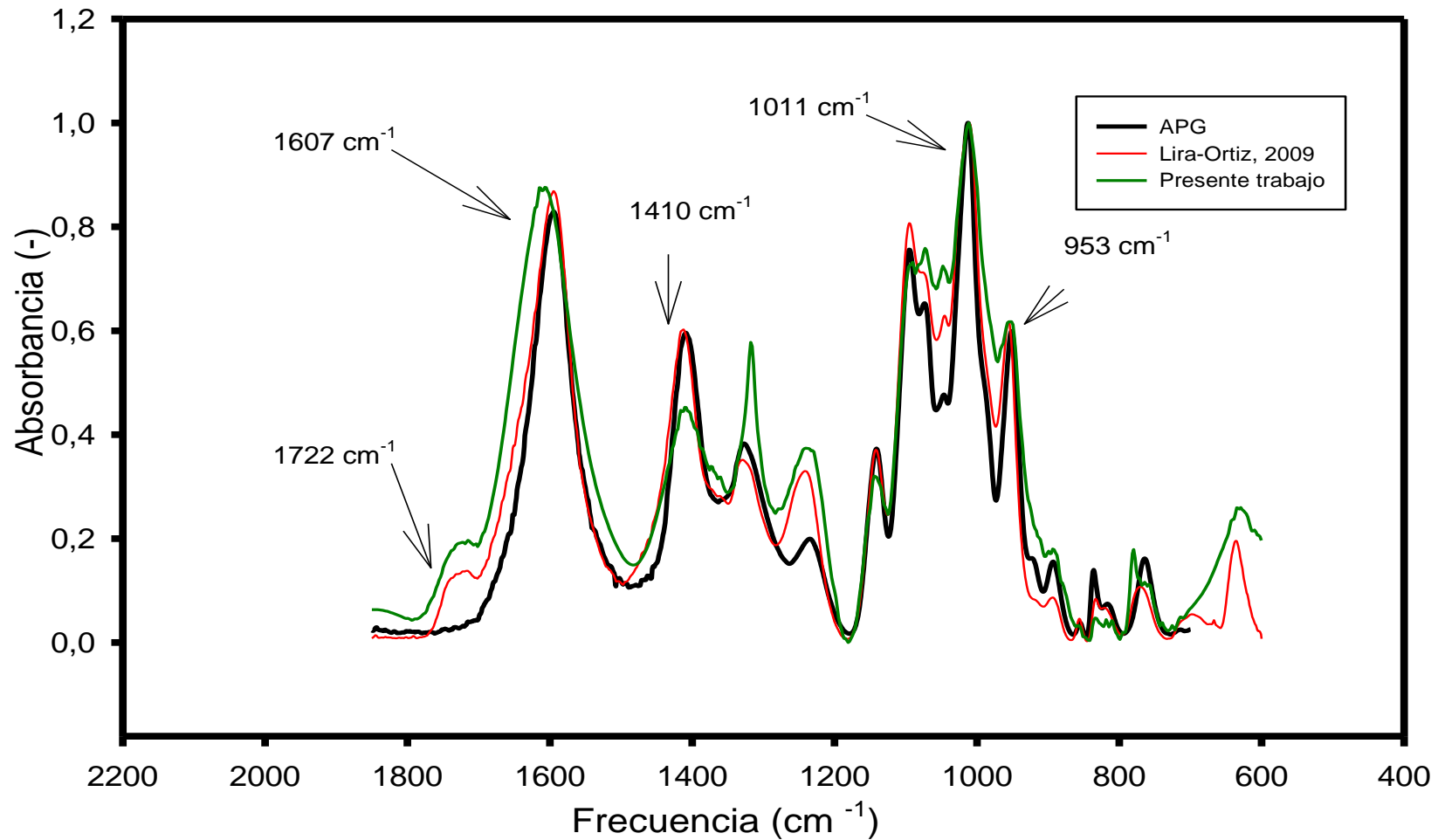


Figura 19: Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier de ácido poligalacturónico, pectina de cáscara de tuna (Lira-Ortiz, 2009) y pectina de cáscara de tuna del presente trabajo.

b) Estimación del grado de metoxilación de la pectina extraída de cáscara de tuna.

Mediante la comparación de espectros de infrarrojo de muestras de APG y pectina con grado de metoxilación conocido (30% y 60%), se pretende suponer el porcentaje de esterificación. En la Figura que 20 que el pico que indica el porcentaje de esterificación (señalado con un círculo) para la pectina analizada en este trabajo es ligeramente superior al que presenta la pectina cítrica con 30% de metoxilación; lo que permite suponer que el porcentaje de esterificación para la pectina de cáscara de tuna de este trabajo es ligeramente superior a 30%.

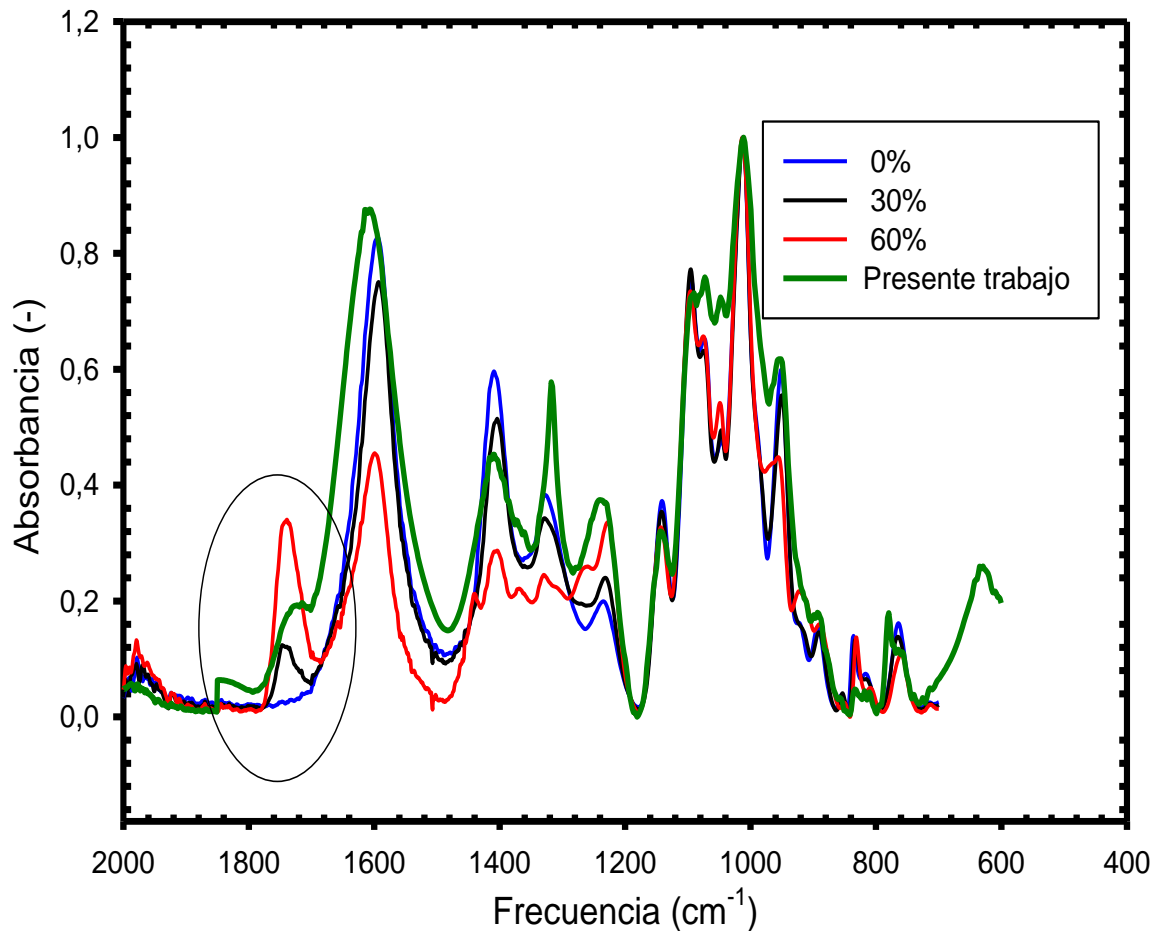


Figura 20. Espectros de infrarrojo por transformadas de Fourier. Comparación de ácido poligalacturónico (0% esterificado), pectinas cítricas con grado de metoxilación conocido (30 % y 60%) y pectina de cáscara de tuna del presente trabajo.

4.4 Pruebas reológicas

4.4.1 Pruebas preliminares

a) Evolución de los módulos dinámicos con la temperatura

En la Figura 21 se muestra la evolución de los módulos dinámicos G' y G'' con la temperatura de soluciones de pectina de cáscara de tuna durante el enfriamiento desde 90 hasta 25°C (1 °C/min). La adición de CaCl_2 en cada solución se realizó en el instante de la colocación de la muestra en la geometría del reómetro, ésta precalentada a 90°C. Como se puede observar en la Figura 21, aún a 90°C todos los sistemas mostraron un carácter viscoelástico sólido, $G' > G''$, el cual se incrementa al disminuir la temperatura. Se observa que a medida que aumenta la relación estequiométrica R , la tasa de cambio de G' es mayor y la diferencia entre G' y G'' se acentúa. Un comportamiento similar se ha observado en pectinas de girasol, linaza y de pomaza de olivo (Cardoso *et al.*, 2003; Díaz-Rojas *et al.*, 2004; Iglesias-Lozano, 2004). Este comportamiento se ha interpretado con base al tipo de interacciones intermoleculares (iónicas y van der Waals) que se llevan a cabo en pectinas de bajo metoxilo. Se sugiere la formación de zonas de unión altamente cooperativas entre cadenas de ácido galacturónico no esterificado y calcio, las cuales inician su formación a temperaturas altas.

De acuerdo a nuestros resultados, la gelificación ocurre instantáneamente una vez que el calcio se adiciona a la solución. Durante el enfriamiento, no sólo continúan las interacciones iónicas (puentes de calcio), sino pueden ocurrir interacciones intermoleculares, principalmente puentes de hidrógeno, entre grupos funcionales de cadenas laterales que fortalecen al gel, incrementando los valores de G' y disminuyendo $\tan \delta (=G''/G')$.

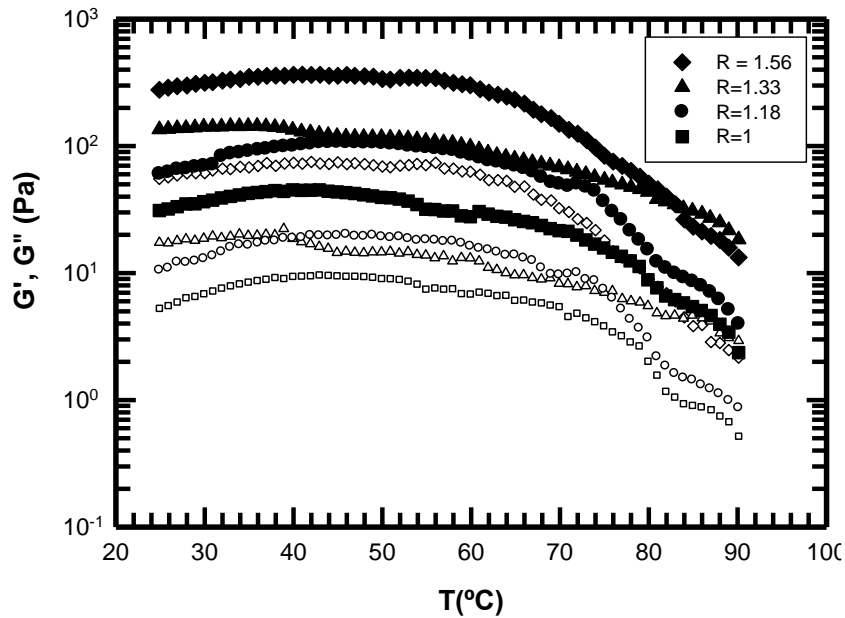


Figura 21. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' durante el enfriamiento de soluciones acuosas de pectina de tuna 0.4% p/p. Velocidad de enfriamiento $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, frecuencia constante de 1 rad/s , las determinaciones se realizaron dentro de la zona lineal de viscoelasticidad usando la geometría de cilindros concéntricos de doble pared. En la parte superior de la Figura se indica la relación estequiométrica R ($=2[\text{Ca}^{2+}]/[\text{COO}^{-}]$) de cada trazo. Los trazos gruesos representan G' mientras que los delgados G'' .

b) Evolución de los módulos dinámicos con el tiempo

En la Figura 22 se muestra la evolución de los módulos dinámicos con el tiempo a 25°C , una vez concluido el proceso de enfriamiento. Este tipo de pruebas, también conocida como “curado de gel”, pretende identificar el estado estacionario de la gelificación, es decir el tiempo que le toma a un sistema reorganizarse hasta llegar a un equilibrio dinámico de formación-rompimiento de interacciones intermoleculares. En la Figura 22 se puede observar que a medida que se incrementa la relación estequiométrica R , los geles inician y terminan con valores mayores de G' , como es de esperarse, ya que se generan mayores interacciones iónicas que fortalecen al gel. Sin embargo, no se detectó el estado estacionario en ninguno de los sistemas aún 11 h después de iniciado el experimento, lo cual indica que los geles de esta pectina son altamente dependientes del tiempo.

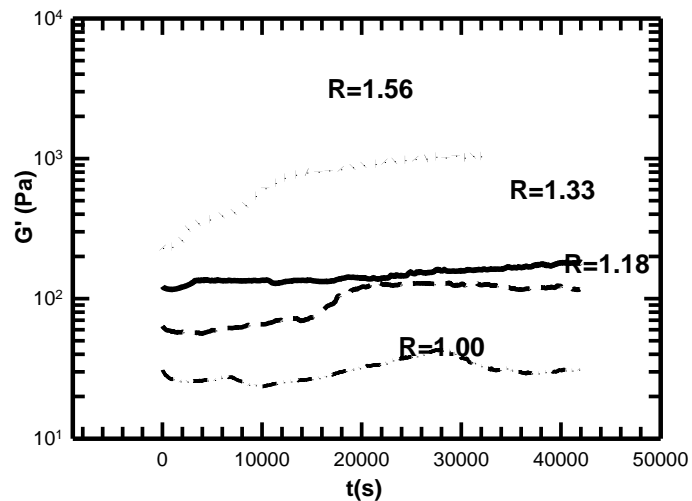


Figura 22. Evolución del módulo de almacenamiento, G' , con el tiempo durante el curado de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) 0.4% p/p: Determinaciones realizadas a frecuencia constante de 1 rad/s y 25 °C dentro de la zona lineal de viscoelasticidad. R representa la relación estequiométrica: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$ de cada trazo.

c) Evolución de los módulos dinámicos con la frecuencia

La evolución de los módulos dinámicos G' y G'' con la frecuencia (espectro mecánico dinámico), usando deformaciones dentro de la zona lineal de viscoelasticidad, nos permite determinar las propiedades viscoelásticas de los geles formados y evaluar su comportamiento reológico en términos del tiempo de observación ($1/\omega$). En la Figura 23 se presentan los espectros mecánicos de los geles de pectina de tuna (0.4%), después del proceso de curado. El comportamiento reológico de estos geles es congruente con lo reportado en la literatura para pectinas de bajo metoxilo de otras fuentes (Durand *et al.*, 1990; Braccini y Pérez, 2001; Díaz-Rojas *et al.*, 2004; Cárdenas *et al.*, 2008; Gigli *et al.*, 2009). Los geles tienen un comportamiento tipo gel débil, G' tienen una débil dependencia con la frecuencia, las pendientes de los gráficos G' vs ω fluctúan entre 0.083 y 0.112, como se muestra en el Cuadro 8. Geles débiles típicos en alimentos son los formados durante la acidificación ácida de la leche, en los cuales

la dependencia de G' con la frecuencia, evaluada a través del valor de n en la relación $G' \propto \omega^n$, se ha reportado ≈ 0.17 (Trejo-Guerrero, 2010). Algunos autores describen a un gel débil como aquel que presenta una ligera dependencia de los módulos dinámicos, especialmente G' , con la frecuencia (Doublier y Cuvelier, 1996). Sin embargo, para esta dependencia no se ha fijado un criterio en los valores. Una forma más precisa de verificar el comportamiento débil o fuerte de un gel es la razón G''/G' , conocida como $\tan \delta$, el criterio aceptado para un gel fuerte es $G' \approx 10G''$ o $\tan \delta < 0.1$ (Doublier y Cuvelier, 1996).

Los valores de $\tan \delta$ para los sistemas de la Figura 23 fueron mayores a 0.13 como se observa en la Figura 24, $\tan \delta$ no muestra una tendencia con R , el gel con mayor contenido de calcio ($R=1.56$), el cual se espera no sólo más rígido, sino más estable, presenta valores de $\tan \delta$ muy dependientes con la frecuencia, lo cual refleja que el sistema tiene varios tiempos de relajación, a frecuencias altas (tiempos cortos de observación) predomina el carácter sólido ($\tan \delta \rightarrow 0.1$), pero al aumentar el tiempo de observación (frecuencias bajas) se incrementa el carácter líquido del gel. Esto refleja la complejidad del sistema en su estructuración y la dependencia que tiene este evento con el tiempo.

Cuadro 8. Valores de n de la relación $G' \propto \omega^n$ en los espectros mecánicos dinámicos de geles de pectina de tuna 0.4% p/p en presencia de distintas concentraciones de calcio. R representa la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$.

$R=2[Ca^{2+}]/[COO^-]$	n	R^2
1.56	0.090	0.995
1.33	0.083	0.998
1.18	0.112	0.999
1.00	0.097	0.997

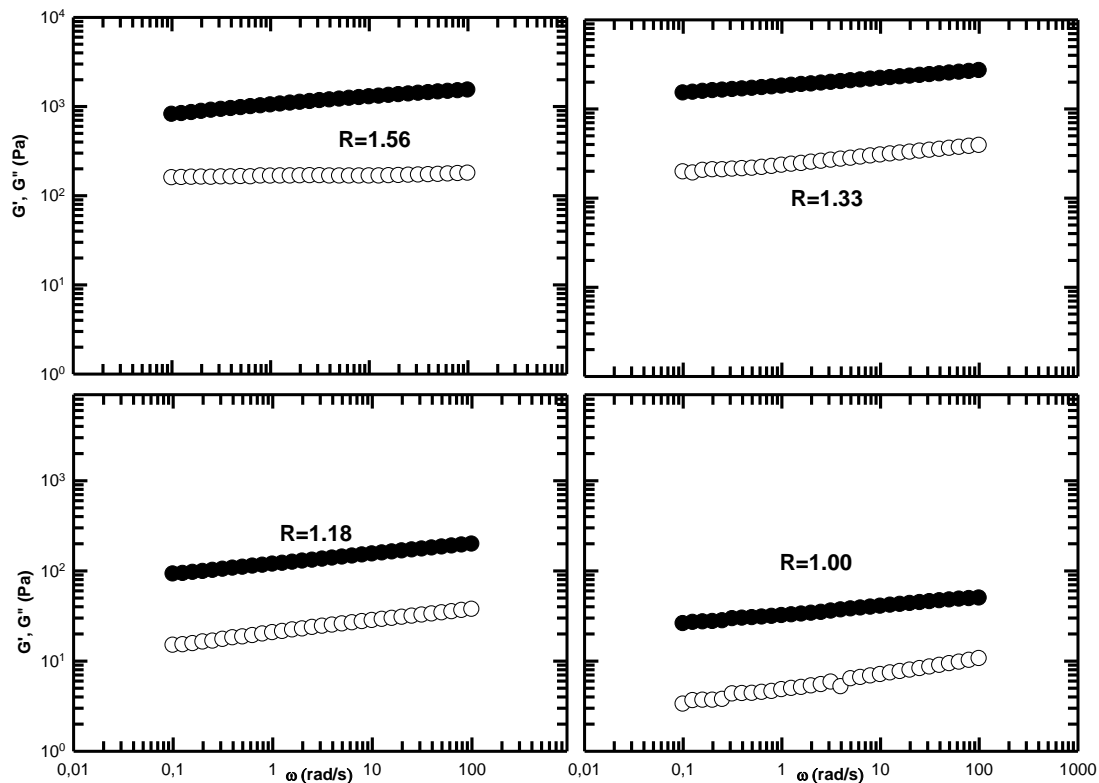


Figura 23. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' con la frecuencia de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Los símbolos negros corresponden a G' y los blancos a G'' .

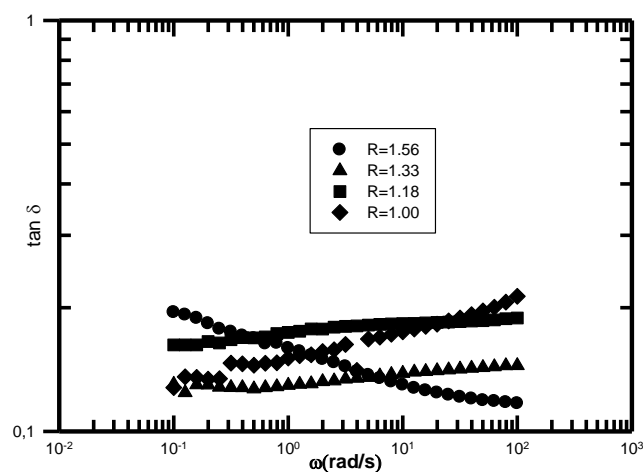


Figura 24. Comportamiento de tangente del ángulo de desfase ($=G''/G'$) de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$.

Las relaciones estequiométricas calcio/pectina usadas generaron sistemas con temperaturas de gelificación altas, lo cual técnicamente dificultó la experimentación, ya que el manejo de las soluciones se hizo a temperaturas de ebullición, generando posiblemente diferencias en la evaporación de la muestra durante su colocación en el reómetro. Adicionalmente, no fue posible determinar el punto de gel debido a la reactividad de la muestra con el calcio, por lo que se decidió trabajar con relaciones estequiométricas menores, manteniendo la concentración de pectina.

4.4.2 Estudios reológicos usando bajas relaciones estequiométricas calcio/pectina

a) Evolución de los módulos dinámicos con la temperatura

En la Figura 25 se muestra la evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , durante el enfriamiento de las soluciones acuosas de pectina 0.4% con distintas relaciones estequiométricas: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. La solución sin calcio adicionado ($R=0$) muestra un comportamiento totalmente fluido ($G''>G'$), aún a 25 °C, lo cual indica que pectina 0.4% no gelifica sin iones adicionados durante el tiempo que dura el enfriamiento. Al incrementar R a 0.11 se observa una transición alrededor de 33 °C, en donde repentinamente se incrementa el carácter sólido de la muestra tendiendo a formar una meseta a bajas temperaturas. Cuando se incrementa R a 0.22, el comportamiento es complejo, las pruebas pierden reproducibilidad, como se ve en las réplicas graficadas, en una de ellas se detecta el incremento repentino de G' sobre G'' y la transición de un estado sol, en donde G'' predomina a temperaturas altas (>69 °C), a un estado gel en donde $G'>G''$. Sin embargo, en la réplica de este experimento no se observa tal transición, a temperaturas altas $G'>G''$ y alrededor de 60°C ambos módulos incrementan alrededor de 2 órdenes de magnitud, manteniéndose $G'>G''$. No obstante, las dos determinaciones concluyen con los respectivos módulos muy cercanos en magnitud. Con $R=0.33$ las soluciones de pectina muestran desde el inicio del enfriamiento ($T=90^\circ\text{C}$), $G'>G''$, es decir existe un carácter sólido aún a esa temperatura.

A medida que ocurre el enfriamiento se presenta un incremento de ambos módulos. Finalmente, igual que en el caso $R=0.22$, las determinaciones no son reproducibles, aunque los valores finales que alcanzan los módulos son muy cercanos. La transición sol-gel detectada en este sistema estuvo en el intervalo de 70 a 84 °C, un intervalo más amplio que el caso anterior.

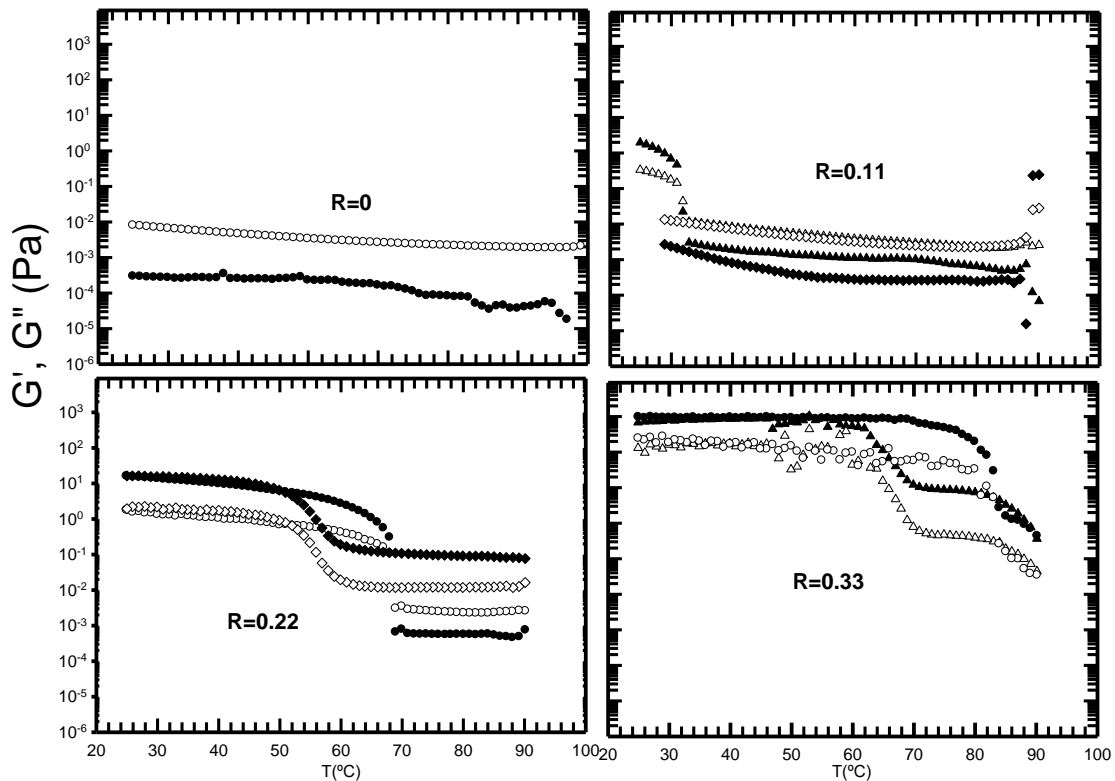


Figura 25. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' durante el enfriamiento de soluciones acuosas de pectina de tuna 0.4% p/p. Velocidad de enfriamiento 1°C/min, frecuencia constante de 1 rad/s, las determinaciones se realizaron dentro de la zona lineal de viscoelasticidad. R indica la relación estequiométrica: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Los símbolos negros corresponden a G' mientras que los blancos a G'' .

Este comportamiento reológico complejo se ha observado en otras pectinas de bajo metoxilo y se ha defendido el modelo de gelificación conocido como “caja de huevo” (Durand *et al.*, 1990; Braccini y Pérez, 2001), el cual propone que la

formación de redes tridimensionales de pectinas de bajo metoxilo involucra dos tipos de entrecruzamientos vía Ca^{2+} , el más extenso en número es la formación de estructuras cortas, diméricas, en donde el calcio queda inmerso entre dos cadenas de segmentos de ácido galacturónico, lo cual asemeja el acomodo de huevos (iones calcio) en su caja (cadenas de polímero).

Estas asociaciones se forman a temperatura alta y les acompaña un mecanismo altamente cooperativo. Además de estas zonas de unión cooperativas, se asume se presentan interacciones iónicas menos específicas entre el calcio y secuencias más cortas de residuos de ácido galacturónico no metoxilado y la asociación de dímeros para formar agregados, se presume que estas asociaciones no cooperativas no contribuyen de forma importante a la fuerza y elasticidad del gel (Durand *et al.*, 1990; Braccini y Pérez, 2001; Díaz-Rojas *et al.*, 2004; Cárdenas *et al.*, 2008).

b) Evolución de los módulos dinámicos con el tiempo

En la Figura 26 se presenta la evolución de los módulos dinámicos durante el curado de soluciones o geles de pectina al 0.4% usando relaciones estequiométricas calcio/pectina inferiores a 1. De interés es el sistema sin calcio ($R=0$), el cual evidencia una estructuración durante su envejecimiento, pasando de un sistema fluido ($G'' > G'$) a un sistema con carácter sólido en donde G' es alrededor de una orden de magnitud mayor a G'' . A medida que se incrementa R , se observa que los sistemas tienden al estado estacionario en menos tiempo y los módulos al final del curado del gel incrementan con R . Con estas determinaciones es notable la transitoriedad de las interacciones que dan lugar al carácter sólido de los geles o soluciones macromoleculares de pectina.

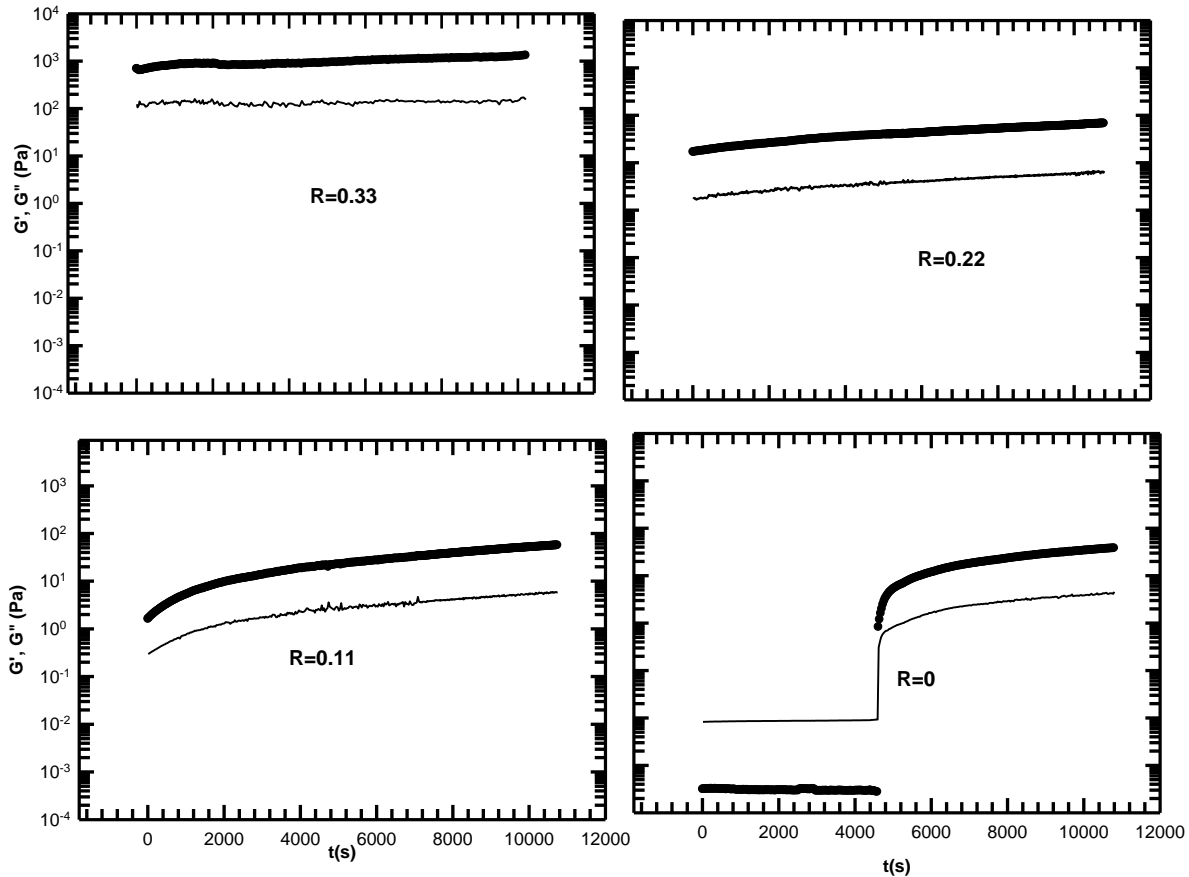


Figura 26. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , con el tiempo durante el curado de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) 0.4% p/p: Determinaciones realizadas a frecuencia constante de 1 rad/s y 25 °C dentro de la zona lineal de viscoelasticidad. R representa la relación estequiométrica: $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Símbolos negros corresponden a G' y líneas a G'' .

c) Evolución de los módulos dinámicos con la frecuencia

Los espectros mecánicos dinámicos de pectina de tuna 0.4% se presentan en la Figura 27. Este espectro nos permite comprobar el carácter de gel débil de los sistemas evaluados. A medida que se incrementa el contenido de calcio en el sistema, los módulos aumentan pero la dependencia de éstos con la frecuencia (Cuadro 9) sigue una tendencia no esperada. Los sistemas con el valor mayor de R (0.33) presentan mayor dependencia con la frecuencia, lo cual los cataloga como más débiles que los restantes sistemas, incluyendo el sistema sin calcio adicionado.

Por otra parte, la diferencia entre G' y G'' es menor en este sistema, lo cual se manifiesta en $\tan \delta$ (Figura 28). De acuerdo a los valores de $\tan \delta$, la pectina de tuna en presencia de calcio manteniendo la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$ igual a 0.11 y 0.22, forma geles fuertes ($\tan \delta \leq 0.1$) que se debilitan a medida que aumenta el tiempo de observación (frecuencias bajas de observación), esto es debido a que el polisacárido no sólo forma puentes de calcio, sino puentes de hidrógeno e interacciones de vida muy corta entre cadenas adyacentes, seguramente conformadas por azúcares neutros de las zonas pilosas de la pectina, que dan lugar a redes no permanentes que manifiestan relajación a bajas frecuencias.

Por lo tanto es posible formar geles rígidos con valores de G' cercanos a 1000 Pa usando valores de $R=0.33$, pero estos geles no serán estables con el tiempo, manifestarán relajación lo cual en un producto o proceso se reflejará en el debilitamiento del gel o en la baja elasticidad de éste. El efecto de la relación estequiométrica en G' de los geles de pectina se muestra en la Figura 29.

Cuadro 9. Valores de n de la relación $G' \propto \omega^n$ en los espectros mecánicos dinámicos de geles de pectina de tuna 0.4% p/p en presencia de distintas concentraciones de calcio. R (0-0.33).

$R=2[Ca^{2+}]/[COO^-]$	n	R^2
0.33	0.099	0.998
0.22	0.061	0.990
0.11	0.075	0.990
0	0.078	0.994

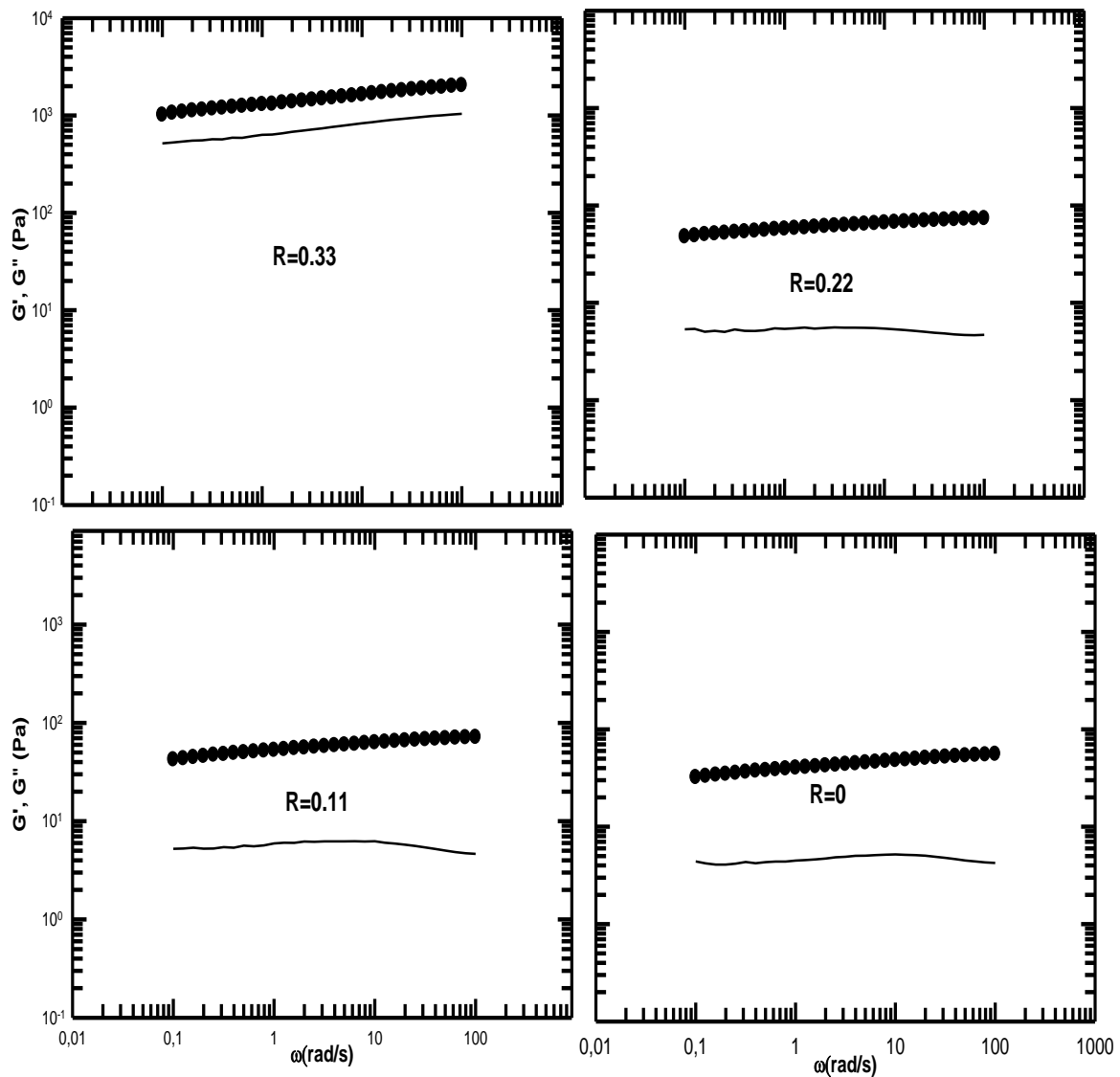


Figura 27. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' con la frecuencia de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$. Los símbolos negros corresponden a G' y las líneas a G'' .

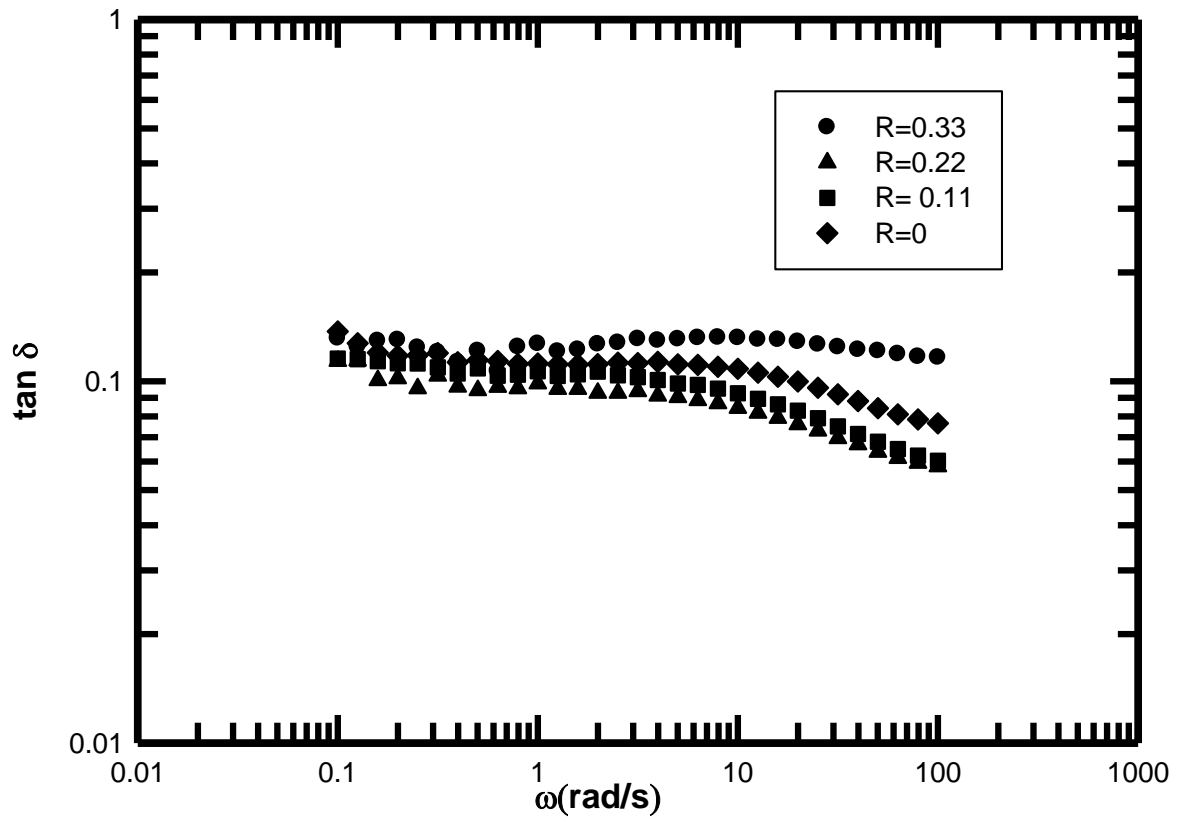


Figura 28. Comportamiento de tangente del ángulo de desfase ($=G''/G'$) de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) 0.4% con distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas a 25°C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. R indica la relación estequiométrica $2[Ca^{2+}]/[COO^-]$.

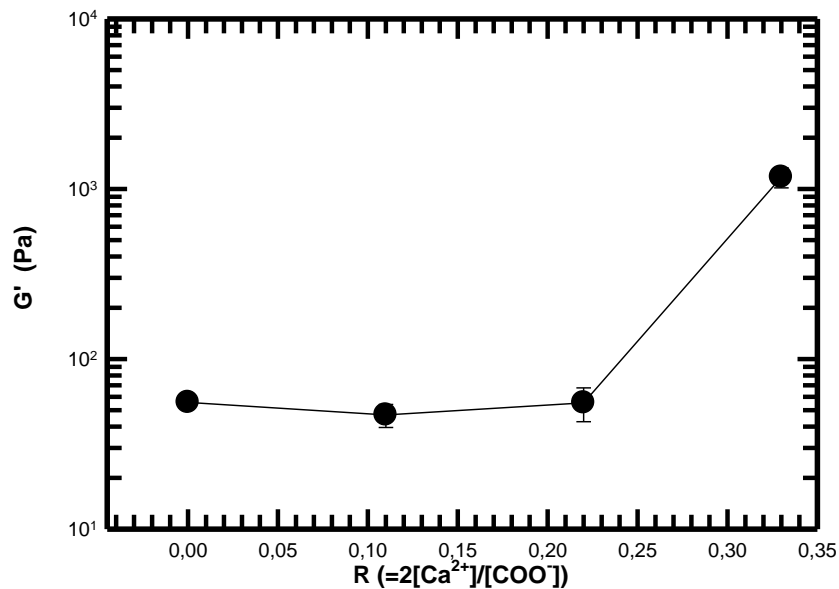


Figura 29. Efecto de la relación estequiométrica, $R=2[Ca^{2+}]/[COO^-]$ en el módulo de almacenamiento de geles de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) al 0.4%. Valores a $\omega=1$ Hz y 25°C tomados de la Figura 28.

El comportamiento reológico de la pectina de tuna estudiada en este trabajo refleja un polisacárido de alto peso molecular, de bajo índice de metoxilación, lo cual lo hace muy reactivo al calcio, gelificando aún a temperaturas cercanas a ebullición. Probablemente sea un polisacárido muy ramificado, de tal forma que por impedimento estérico la gelificación sea muy dependiente del tiempo, pero la presencia de estas ramificaciones promueva interacciones entre cadenas adyacentes, tipo puente de hidrógeno, las cuales fortalecen el carácter sólido del sistema reflejándose en valores de G' progresivamente mayores. Sin embargo, cuando el calcio está en exceso se generan sistemas menos elásticos con diferentes tiempos de relajación, posiblemente por la formación de distintos tipos de enlaces, predominando las asociaciones iónicas muy cooperativas que pueden dar lugar a zonas de unión fuertes locales, presumiblemente entre dímeros de cadenas de ácido galacturónico, que comparten el volumen con zonas amorfas menos entrecruzadas.

Capítulo 5

Conclusiones y Recomendaciones para trabajos futuros

5.1 Conclusiones

El polisacárido extraído de cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan, es un polímero formado básicamente por 3 fracciones de masas moleculares altas, 1556, 996.9, 599.2 kDa, que corresponden al 42, 34 y 22% del polímero. Los análisis de FTIR confirman que el polisacárido tiene rasgos estructurales de pectinas de bajo metoxilo, estimándose un porcentaje de esterificación ligeramente superior a 30%.

El comportamiento reológico de la pectina de tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.) muestra una reactividad alta al calcio, gelifica aún a temperaturas cercanas a ebullición. A medida que se incrementa la relación estequiométrica $R=2[Ca^{2+}]/[COO^-]$, los geles inician y terminan con valores mayores de G' sin llegar al estado estacionario durante el curado del gel, lo cual indica que estos geles son altamente dependientes del tiempo.

De forma general, los geles de pectina de tuna tienen un comportamiento viscoelástico tipo gel débil. Sólo las relaciones estequiométricas $R=0.11$ y 0.22 , formaron geles que se catalogan como fuertes ($\tan\delta \leq 0.1$). No obstante, el comportamiento reológico de éstos indica distintos tipos de zonas de unión, ya que se presentan una relajación de enlaces en tiempos pequeños de observación (frecuencias altas).

Se sugiere, con base a la revisión bibliográfica y a estos resultados, la formación de zonas de unión altamente cooperativas entre cadenas de ácido galacturónico no esterificado y calcio, las cuales inician su formación a temperaturas altas, y durante el enfriamiento se propician puentes de hidrógeno e interacciones iónicas entre cadenas laterales. Es posible, que este polisacárido tenga una estructura muy ramificada que genera geles débiles altamente dependientes del tiempo.

5.2 Recomendaciones para trabajos futuros

Determinar la composición de azúcares neutros, ácido galacturónico y grupos acetilo de la muestra de pectina de tuna evaluada reológicamente.

Analizar el efecto del tiempo de exposición de las soluciones acuosas a altas temperaturas y la depolimerización en el comportamiento reológico.

Hidrolizar la pectina de cáscara de tuna usando métodos enzimáticos y/o químicos para controlar las propiedades reológicas en función de la masa molecular y ramificaciones del polisacárido

Analizar la microestructura de los geles de pectina de tuna a través de microscopía de fuerza atómica o confocal.

Analizar las propiedades de superficie de la pectina de cáscara de tuna.

Evaluar la funcionalidad del polisacárido como material de pared para encapsular aditivos alimentarios (antioxidantes, colorantes, sabores etc.), así como sus propiedades en la elaboración de películas.

.

Capítulo 6

Referencias Bibliográficas

Aguilera, J. M., Stanley, D. W., (1999). Fundamentals of Structuring Polymer, Colloid, and Materials Science. En "Microstructural principles of food processing and engineering" J. M. Aguilera, D. W. Stanley, (eds). An Aspen Publications. United States of America. p.135.

Akhtar, M., Dickinson, E., Mazoyer, J., Langendorff, V., (2002). Emulsion stabilization of depolymerised pectin. *Food Hydrocolloids*, 16, 249-256.

Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., (1996). Progress in Biotechnology. En "Pectin and Pectinases", P. Albersheim, A. G. Darvill, M. A. O'Neill, H. A. Schols, A J. Visser, A. G. J. Voragen (eds). Elsevier. Amsterdam, pp. 47-55.

AOAC, (1998). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.

Braccini, I., Pérez, S., (2001). Molecular basis of Ca^{2+} -Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model revisited, *Biomacromolecules*, 2, 1089-1096.

Brejnholt A. M., (2010), Pectins. En "Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents" A. Imeson (ed). Ed. Wiley-Blackwell, United Kingdom, pp. 237-262.

Cárdenas, A., Goycoolea, F. M., Rinaudo, M., (2008). On the gelling behaviour of "nopal" (*Opuntia ficus-indica*) low methoxyl pectin, *Carbohydrate Polymers* 73, 212-222.

Cardoso S., Coimbría M. A., Lopes da Silva J. A., (2003). Temperature dependence of the formation and melting of pectin - Ca^{2+} networks: a rheological study, *Food Hydrocolloids* 17, 801-807.

Chatjigakis, A. K., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P., Polissiou, M., (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37, 395-408.

Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B., (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advanced in Polymer Science*, 83, 57-192.

Contreras-Esquivel, J.C., Espinosa-Pérez, J.D., Montañez, J.C., Charlez-Rodríguez, A.V., Renovato, J.; Aguilar, C.N., Rodríguez-Herrera, R., Wicker, L. (2007). Extraction and characterization of Pectin from novel sources. *American Chemical Society*, 935, 215-229.

Coultate T. P., (2009). Polysaccharides. En "Food, The Chemistry of its Components", T. P. Coultate (ed), RS Publishing, United Kingdom, pp. 60-66

CPKelco, (2010).<http://www.cpkelco.com/products-pectin.html>. Último acceso 17 junio de 2010.

Díaz-Rojas E. I., Pacheco-Aguilar R., Lizzardi J., Argüeyes-Monal W., Valdez M. A., Rinaudo M., Goycoolea F. M., (2004). Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil, *Food Hydrocolloids* 18, 293-304.

Doublier, J. L., Cuvelier, G., (1996). Gums and Hydrocolloids: Functional Aspects. En "Carbohydrates in Food". J. L. Doublier, G. Cuvelier (eds). A. C. E. Eliasson, Marcel Dekker, Inc. New York, pp 283-318.

Drusch S., (2006). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray drying. Short communication. *Food Hydrocolloids* 21, 1223-1228

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

Durand, D., Bertrand, C., Clark, A. H., Lips A., (1990). Calcium-induced gelation of low methoxy pectin solutions- Thermodynamic and rheological considerations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12 (1), 14-18.

Endreß, H. U., y Rentschler, C. (1999). Chances and limit for the use of pectins as emulsifier- Part 1. *The European Food and Drink Review*, 49-53.

Forni, E., Penci, M., Polensello, A., (1994). A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydonia oblonga Mill*) and prickly pear (*Opuntia ficus-ndica*) peel. *Carbohydrate Polymers*, 23, 231-324.

Fraeye, I., Doungra, E., Duvetter, T., Moldenaers, P., Van Loey, A., Hendrickx, M., (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2069-2077.

Gallegos-Vázquez, C.; J. Cervantes-Herrera; A. F. Barrientos-Prieto. (2005). Manual Gráfico para la Descripción Varietal del Nopal Tunero y Xoconostle (*Opuntia spp*). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas – Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SNICS – SAGARPA) y la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH). Chapingo, México. 116 p.

Gigli, J., Garnier, C., Piazza, L., (2009). Rheological behaviour of low-methoxyl pectin gels and extended frequency window. *Food Hydrocolloids*, 23, 1406-1412.

Goodwin J. W., (2008). Concentrated dispersions. En "Colloids and interfaces with Surfactants, An Introduction". J. W. Goodwin (ed). John Wiley & Sons, Portland, Oregon, United States of America, Pp. 241-279.

Grommer, A., Kirby, A. R., Gunning, A. P., Morris, V. J., (2009). Interfacial structure of sugar beet pectin studied by atomic force microscopy. *American Chemical Society Lagmuir*, 25(14), 8012-8018.

Grosso, C. R. F., Rao, M. A., (1998). Dynamic rheology of structure development in low-methoxyl pectin+Ca²⁺+sugar gels. *Food Hydrocolloids*, 12, 357-363.

Gunasekaran, S., Ak, M. M., (2003). Nonlinear Viscoelasticity of Cheese. En "Cheese Rheology and Texture", S. Gunasekaran, M. M. Ak (eds). CRC Press, Boca Raton Florida, United States of America.

Habibi, Y., Heyraud, A., Mahrouz, M., Vignon, M.R., (2004a). Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 339, 1119-1127

Habibi, Y.; Mahrouz, M.; Marais, M.F.; Vignon, M.R. (2004b). An arabinogalactan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 339, 1201-1205.

Habibi, Y.; Mahrouz, M.; Vignon, M.R. (2005). Arabinan-rich polysaccharides isolated from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Polymers*, 60, 319-329.

Ibarz A., Barbosa-Canovas G. V., (2005). Reología de productos alimentarios. En "Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos" A. Ibarz, G. V. Barbosa-Canovas (eds). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid España, pp. 128-134.

Iglesias, M. T., Lozano, J. E., (2004). Extraction and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, 62, 215-223.

Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellnwer, N., Ebringerová, A., (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195-203.

Kiong, S. C., Williams, P. A., Cui, S. W., Wang, Q., (2008). Characterization of the surface-active components of sugar beet pectin and the hydrodynamic thickness of the adsorbed pectin layer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8111-8120.

Kirby, A. R., MazDougall, A. J., Morris, V. J., (2006). Sugar beet pectin-protein complexes. *Food Biophysics*, 1(1) 51-56.

Kravtchenko, T. P., Voragen, A. G., Pilnik, W., (1992). Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydrate Polymers*, 18, 17-25

Lapasin R., Prici S., (1999). Rheology. En "Rheology of Industrial Polysaccharides, Theory and Applications" R. Lapasin, S. Prici (eds). An Aspen Publicaciones, United States of America, pp. 170-247

Larson, R. G., (1994). Nonlinear Viscoelasticity. En "Rheology, Principles, measurements and applications". C. W. Macosko (ed)., Wiley- CH, Canada, pp. 162-166.

Leroux, J., Langendorff, Schick, G., Vaishnav, V., Mazoyer, J., (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids* 17, 455-462.

Lira-Ortiz, A. L., (2009). Estudio químico y reológico de polisacáridos tipo pectina de la cáscara de tuna (*Opuntia spp*). Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias

Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios

Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo, México.

Lopes Da Silva, J.A., Rao, M.A., (2007). Rheological Behavior of Food Gels En “Rheology of Fluid and Semisolid Foods. Principles and Applications”, M. A. Rao (ed)., Second edition. Springer, New York, United States of America, pp 339-388.

Lozada-Carbajal, M. A., (2007). Extracción y caracterización reológica de polisacáridos tipo pectina de la cáscara de tuna (*Opuntia spp.*). Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo, México.

Majdoub, H., Roudesli, S., Dertrani, A., (2001a). Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behavior. *Polymers International*, 50, 552-560.

Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Muller, G., Grisel, M., (2001b). Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physic-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46, 69-79.

Matsuhiro, B., Lillo, L.E., Sáenz, C., Urzúa, C.C., Zárate, O. (2005). Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Polymers*, 63, 263-267.

McCann, M. C., Roberts, K., (1991). Architecture of the primary cell wall. En “The cytoskeletal basis of plant growth and form”, M. C. McCann, K. Roberts. London C.W., Academy of London, pp. 109-129.

Monsoor, M. A., Kulapathy, U, Proctor A., (2001). Improved method for determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier

transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2756-2760.

Nakauma, M., Funami, T., Noda, S., Ishihara, S., Al-Assaf, S., Nishinari, K., Phillips, G. O., (2008). Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* 22, 1254-1267.

Núñez-Santiago, M. C. (2007). Reología y ultraestructura de pastas y geles de κ -carragenina y almidón de maíz ceroso reticulado. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Oosterveld, A., Voragen, A. G. P., Schols, H. A., (2002). Characterization of hop pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Analytical Chemistry*, 29, 819-921.

Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., (2000). Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectin polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 328, 185-197.

Ovodov, Y. S., (2009). Current views on pectin substances en *Russian Journal of Biorganic Chemistry*, 35, 269-284.

Rao, M. A., (1999). Measurement of Flow and Viscoelastic properties. En "Rheology of Fluid and Semisolid Foods, Principles and Applications", M. A. Rao (ed). An Aspen Publication, Cornell University, Geneva, New York.

Rooker, W. A., (1927). New uses of fruit pectin. The Fruit Products, *Journal and American Vinegar Industry*, 7, 11.

Steffe J. F., (1996). Viscoelasticity. En "Rheological Methods in Food Process Engineering", J. F. Steffe (ed). Second edition, Freeman Press, United States of America, pp. 294-338.

Steinbüchel, A., Ki, R. S, (2005). Pectins. En 2Polysaccharides and polyamides in the food industry", A. Steinbüchel, R. S. Ki (eds). Wiley-VCH, Deutschland, pp. 354-376 .

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. (2001). Aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo. En "Principios de Análisis Instrumental" D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman (eds). Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid, España, pp 400-458.

Synytsya, A.; Čopíková, J.; Matějka, P.; Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54, 97-106.

Taiz L., Zeiger E., (2006). Fisiología Vegetal, Tercera edición, Arned, Sao Paulo, Brasil, p.35

Thibault, J.F., Rinaudo, M., (1986). Chain association of pectin molecules during calcium-induced gelation. *Biopolymers*, 25, 455-468.

Thygesen, L. G, Løkke, M. M.; Micklander, E.; Engelsen, S. B. (2003). Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 50-57.

Trejo-Guerrero, M., (2010). Estudio reológico de la gelificación ácida de la leche en presencia de polisacáridos formadores de redes. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo, México.

Willats, W. G. T, Knox, J. P., Mikkelsen, J. D., (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel, Review, *Trends in Food Science & Technology* 17, 97-104.

Williams, P. A., Sayers, C., Viebke, C., Senan, C., Mazoyer, J., Boulenguer, P., (2005). Elucidation of the emulsification properties of sugar beet pectin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3592 - 3597.

Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., Paquot, M., (2007). Effect of extractions conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts, *Food Chemistry* 100, 1356-1364.

Yoo, S.-H., Fishman M. L., Hotchkiss, Jr., A. t., Gyu, L. H., (2006). Viscosimetric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectins solutions, *Food Hydrocolloids* 20, 62-67.