



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA ACADÉMICA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Extracción asistida por ultrasonido de pectinas
de cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.):
Efecto en las propiedades macromoleculares
del polisacárido.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

Ing. Sixto Josué Pérez Campos

Dirección:	Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández.
Codirección:	Dr. Norberto Chavarría Hernández.
Asesor:	Dr. Alberto Tecante Coronel.
Asesor:	Dra. Rosa Hayde Alfaro Rodríguez.

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Marzo 2014.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Mtro. Julio César Leines Medécigo
Director de Administración Escolar
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
PRESENTE

A través de este conducto le informamos atentamente que después de haber revisado la Tesis intitulada: “**Extracción asistida por ultrasonido de pectinas de cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa*): Efecto en las propiedades macromoleculares del polisacárido**”, presentada por el estudiante **Sixto Josué Pérez Campos** como parte de los requisitos para la obtención del Grado de Maestro en Ciencia de los Alimentos, consideramos que cumple con los elementos suficientes de contenido y forma para su defensa oral en el Examen de Grado correspondiente, por lo que otorgamos nuestra aprobación para su impresión.

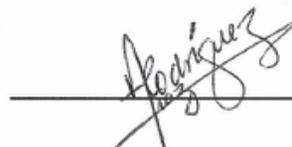
ATENTAMENTE
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, a 10 de Febrero de 2014.

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
Directora de Tesis

Dr. Norberto Chavarría Hernández
Códigoirector de Tesis

Dr. Alberto Tecante Coronel
Asesor

Dra. Rosa Hayde Alfaro Rodríguez
Asesora









AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, institución que me permitió realizar mis estudios de posgrado y licenciatura. En segunda estancia, agradezco al Instituto de Ciencias Agropecuarias por permitirme forjar los conocimientos y ética profesional necesaria para ser un profesional capaz y esforzado, y al Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos UAEH-ICAp donde se me permitió realizar las actividades y experimentos necesarios para la formación del presente trabajo.

Agradezco a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (412344) que me otorgó durante los 2 años que duraron mis estudios. Gracias a esta beca pude enfocarme al 100% en mis estudios y en la realización de este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, por el apoyo, confianza, amistad y comprensión que me ofreció durante la realización de este trabajo, en verdad, muchas gracias por todo.

Al Dr. Norberto Chavarría Hernández, por todo el apoyo, amistad y confianza depositada, con la cual, ha contribuido a la formación de la persona y profesionalista que ahora soy.

Agradezco al Dr. Alberto Tecante Coronel por el tiempo y las sugerencias hechas a este trabajo, siempre sus comentarios me muestran una nueva perspectiva y me muestran que siempre hay mucho que aprender, gracias por todo.

Agradezco a la Dra. Rosa Hayde Alfaro Rodríguez por ser parte del comité evaluador y por el gran apoyo que ha mostrado hacia mi persona, gracias por ser una gran persona y la disponibilidad que siempre ha tenido.

Agradezco al Dr. Guillermo Arlando López Huape por el tiempo y todas las sugerencias para la realización de este trabajo. Además de la capacitación y accesibilidad que me ofreció para el uso del equipo de ultrasonido utilizado en este trabajo de investigación.

Agradezco a la Dra. Elvira Ríos Real por los análisis de peso molecular, azúcares neutros y contenido de grupos acetilo y metoxilo, realizados en la Central Analítica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Zacatenco.

Agradezco al Dr. Edgar García Hernández por el apoyo y la confianza en la realización de los estudios de FTIR, en el Instituto Tecnológico de Zacatepec, Morelos.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por la oportunidad de darme un gran angelito que siempre me cuida desde el momento que nací, mi madre; María del Socorro Campos García. Y a ti mamá, nunca encontraré las palabras correctas de decirte cuanto te quiero y cuanto te debo, Gracias por todo.

A mi padre Elpidio, los dos somos personas con caracteres fuertes, ni modo teníamos que ser padre e hijo. Por eso no me asombran nuestras diferencias, pero sabes: "Te quiero y aprecio mucho".

A las personas que han dejado huellas imborrables en mi corazón y ya no están con nosotros, Jesús Campos García, Evangelina García y Gerarda Romero. Son parte de mi corazón y mi ser, gracias por los consejos que me dieron en vida, nunca los olvidaré.

A mis hermanos y sus familias: Víctor, José Alberto, Edith, Esperanza, sobrinos y sobrinas, gracias por su cariño y apoyo.

A Lorena Rivera y su familia, que últimamente se han vuelto parte de mi vida, compartiendo mis logros y fracasos, gracias por estar cerca de mí.

Dedico este trabajo finalmente a toda mi familia: mi tía María, mi tía Lidú, mi tía Vicky, mi tía Teresa, Israel Robledo, Raúl Chávez, a todos mis tíos, tías y primos, que gracias a Dios son muchos, saben muy bien que me falta mucho papel para nombrarlos a todos, pero espero que siempre sepan que los llevo en el corazón. "Gracias a todos por confiar en mí y demostrarme su amor".

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	4
2.1	Tecnologías emergentes en el procesamiento de alimentos.....	4
2.2	Ultrasonido y su aplicación en la industria de alimentos.....	5
2.2.1	Cavitación.....	8
2.3	Extracción de polisacáridos asistida por ultrasonido.....	10
2.4	Variables a considerar en el uso de ultrasonido para la extracción de polisacáridos y compuestos naturales.....	19
2.4.1	Potencia de ultrasonido.....	19
2.4.2	Frecuencia.....	20
2.4.3	Temperatura.....	21
2.4.4	Características del reactor.....	21
2.4.5	Interacción disolvente-muestra.....	22
2.5	Pectinas.....	23
2.5.1	Estructura química de las pectinas.....	23
2.5.2	Gelificación de pectinas.....	25
2.6	Pectinas de cáscara de tuna.....	27
3.	JUSTIFICACIÓN.....	30
4.	OBJETIVOS.....	32
4.1	Objetivo general.....	32
4.2	Objetivos particulares.....	32
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
6.	HIPÓTESIS.....	34
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1	Tuna.....	35
7.2	Métodos.....	37
7.2.1	Extracción de pectina de cáscara de tuna.....	37
7.2.2	Determinación del rendimiento total y productividad final del proceso de extracción.....	39
7.2.3	Purificación de la pectina extraída.....	40
7.2.4	Determinación de proteína.....	41

7.3	Parámetros macromoleculares de las pectinas extraídas	42
7.3.1	Identificación de grupos funcionales por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	42
a)	Determinación de ácidos urónicos.....	42
b)	Determinación de pesos moleculares	43
c)	Determinación del grado de metoxilación y acetilación.....	44
d)	Cuantificación de azúcares neutros.....	45
7.3.2	Caracterización reológica	45
a)	Pruebas de cizalla estacionaria.....	45
b)	Pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud.....	46
7.4	Análisis estadístico.....	47
8.	<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	48
8.1	Rendimiento y productividad de las extracciones	48
8.2	Parámetros macromoleculares de las pectinas extraídas.	54
8.2.1	Espectroscopia de infrarrojo con trasformada de Fourier (FTIR).	54
8.2.2	Distribución de pesos moleculares.....	69
8.2.3	Determinación de ácido galacturónico, azúcares neutros, grupos acetilo y grupos metoxilo de las pectinas extraídas.....	74
8.4	Caracterización reológica.....	79
8.4.1	Pruebas de cizalla estacionaria.....	79
8.4.2	Pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud.....	87
9.	<i>CONCLUSIONES.....</i>	98
10.	<i>PERSPECTIVAS.....</i>	101
11.	<i>REFERENCIAS.....</i>	102
12.	<i>ANEXOS.....</i>	110

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad en procesos alimentarios.....	7
Cuadro 2. Aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad en procesos extracción de compuestos naturales.	14
Cuadro 3. Estudios del ultrasonido de alta intensidad en extracción de polisacáridos.	15
Cuadro 4. Parámetros cualitativos determinados a la tuna usada en este trabajo.	36
Cuadro 5. Parámetros cuantitativos determinados en tunas usadas en este trabajo.	36
Cuadro 6. Matriz experimental del presente trabajo de investigación.	39
Cuadro 7. Humedad y cenizas de la cáscara fresca de tuna.....	48
Cuadro 8. Rendimiento total y productividad final de la extracción de polisacáridos pécticos de tuna.	49
Cuadro 9. Contenido de proteína en la fracción soluble e insoluble de polisacáridos extraídos de la cáscara de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> S.).....	62
Cuadro 10. Distribución de peso molecular de los polisacáridos pécticos extraídos de la cáscara de tuna (<i>O. albicarpa</i> S.).....	70
Cuadro 11. Contenido de ácido galacturónico, grupos acetilo, grupos metoxilo y azúcares neutros de las pectinas extraídas por ultrasonido de alta intensidad.	77
Cuadro 12. Azúcares neutros y ácido galacturónico de pectinas extraídas de cáscara de tuna (<i>Opuntia</i> spp.).....	78
Cuadro 13. Propiedades reológicas en flujo cortante simple de soluciones acuosas de pectina de tuna al 2% p/p. Modelos de Cross y Ostwald-de Waele. Determinaciones realizadas a 25 °C. Polisacáridos pécticos extraídos a 60 °C.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido de alta intensidad.....	9
Figura 2. Número de artículos publicados de extracción asistida por ultrasonido en los últimos 30 años.....	12
Figura 3. Representación esquemática de la rarefacción y el ciclo de compresión.	13
Figura 4. Representación esquemática de los elementos estructurales de pectinas.....	24
Figura 5. Representación de la estructura básica de las pectinas.....	25
Figura 6. Esquematización de los entrecruzamientos de pectina de bajo metoxilo a través de iones calcio.	26
Figura 7. Estructura química de la cadena ramificada de pectina de tuna (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....	28
Figura 8. Región geográfica donde fueron recolectadas las tunas (<i>Opuntia albicarpa</i> , Scheinvar) usadas en este estudio.....	35
Figura 9. Tuna blanca (<i>Opuntia albicarpa</i> S.) variedad Alfajayucan, usadas en este trabajo.	36
Figura 10. Montaje experimental para la extracción convencional de pectinas de cáscara de tuna.	38
Figura 11. Montaje experimental del proceso de extracción asistida con ultrasonido.....	38
Figura 12. Rendimiento de extracción de pectinas de la cáscara de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> S.), en los distintos tratamientos examinados.....	51
Figura 13. Productividad del proceso de extracción de pectinas de la cáscara de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> S.) en los distintos tratamientos examinados.	54

Figura 14. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de las pectinas sin purificar de la cáscara de tuna, comparados con pectina cítrica usada como referencia.	56
Figura 15. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de las pectinas sin purificar de la cáscara de tuna, comparados con pectina cítrica usada como referencia.	57
Figura 16. Región ampliada de los espectros FTIR. Se señalan los picos de absorción de los grupos COO-R (1744 cm^{-1}) y los grupos COO ⁻ (1611 y 1413 cm^{-1} ; estiramientos asimétricos y simétricos respectivamente).	60
Figura 17. Región ampliada ($1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) de los espectros de FTIR, donde se puede observar la huella dactilar de las pectinas.	61
Figura 18. Espectros FTIR de los polisacáridos pécticos clarificados, comparados con pectina cítrica. Extracciones realizadas a 90% de amplitud ultrasónica y 60 °C	63
Figura 19. Espectros FTIR de los polisacáridos pécticos clarificados, comparados con estándar de pectina cítrica. Extracciones realizadas a 30% de amplitud ultrasónica y a 60 °C	64
Figura 20. Espectros FTIR de los polisacáridos pécticos clarificados, comparados con estándar de pectina cítrica. Extracciones realizadas a 30% de amplitud ultrasónica y a 40 °C	65
Figura 21. Región ampliada de $1800\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ de los espectros de FTIR de los extractos clarificados.	67
Figura 22. Región ampliada de $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ de los espectros de FTIR, donde se puede observar la huella dactilar de las pectinas (1145 , 1103 , 1077 , 1050 y 1017 cm^{-1}).....	68
Figura 23. Curvas de viscosidad de pectinas de cáscara de tuna al 2% p/p y 25 °C. Extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad, 30% de amplitud a 60 °C.	81

Figura 24. Curvas de viscosidad de pectinas de cáscara de tuna al 2% p/p y 25 °C. Extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad, 90% de amplitud a 60 °C.....	83
Figura 25. Valores de viscosidad de disoluciones de pectinas de cáscara de tuna extraídas por ultrasonido de alta intensidad al 2% p/p a diferentes tiempos y % AU. Se presentan también los valores de viscosidad de pectina cítrica comercial al 2% p/p.	85
Figura 26. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) durante el enfriamiento de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas por ultrasonido de alta intensidad usando 30% AU, 60 °C y diferentes tiempos de extracción.	89
Figura 27. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) durante el enfriamiento de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas por ultrasonido de alta intensidad usando 90% AU, 60 °C y diferentes tiempos de extracción.	90
Figura 28. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) en función del tiempo de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas con la asistencia de ultrasonido de alta intensidad usando 30% AU, 60 °C y diferentes tiempos de extracción.....	92
Figura 29. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) en función del tiempo de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas con la asistencia de ultrasonido de alta intensidad usando 90% AU, 60 °C y diferentes tiempos de extracción.....	93
Figura 30. Espectros mecánicos de pectina de tuna en solución (<i>Opuntia albicarpa</i> S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (30% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C.	94

Figura 31. Espectros mecánicos de pectina de tuna en solución (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (90% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C.95

Figura 32. Tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) en función de la frecuencia de disoluciones de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p. Pectinas extraídas a 30 y 90% AU.97

ÍNDICE DE FIGURAS (ANEXOS)

Figura A-1. Zona de viscoelasticidad lineal de soluciones de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (30% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C.110

Figura A-2. Zona de viscoelasticidad lineal de soluciones de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (90% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C.111

NOTACIÓN

% AU	Porcentaje de amplitud ultrasónica
b.h.	Base húmeda
b.s.	Base seca
DM	Grado de metoxilación
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
Da	Dalton
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
K	Índice de consistencia, Modelo Ostwald-de Waele ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)
m	Masa de la muestra (g)
m	Exponente adimensional del Modelo Reológico de Cross
m/m	Relación masa-masa
Meq	Miliequivalentes químicos
M	Molaridad
MW	Peso molecular
n	Índice de flujo, modelo de Ostwald-de Waele (-) -

NR	No reportado
p/p	Relación peso-peso
p/v	Relación peso-volumen
% p/p	Porcentaje peso-peso
% p/v	Porcentaje peso-volumen
ppm	Partes por millón
PT	Polisacárido péctico extraído de la cáscara de tuna, pectina de tuna
T	Temperatura (°C)
T	Tiempo (h, min y s)
v/v	Relación volumen-volumen
R	Rendimiento de extracción
rpm	Revoluciones por minuto

SUBÍNDICES Y PREFIJOS

M	Mili (1×10^{-3})
μ	Micro (1×10^{-6})

SÍMBOLOS GRIEGOS

λ	Constante de tiempo del modelo de Cross	s
μ	Viscosidad newtoniana	Pa·s

η	Viscosidad no newtoniana	Pa·s
η_0	Viscosidad newtoniana a bajos valores de cizalla	Pa·s
σ	Esfuerzo cortante	Pa
$\dot{\gamma}$	Velocidad de corte	s ⁻¹

RESUMEN

Este trabajo consistió en la extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad de pectinas de cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.), usando 30% de amplitud ultrasónica (AU) a 40 °C y 60 °C, y 90% AU a 60 °C. También se realizó la extracción en tanque agitado, que es la extracción convencional reportada en estudios previos (Lira-Ortiz et al., 2014). Los parámetros evaluados fueron: el rendimiento total de extracción (sólidos insolubles en alcohol/sólidos cáscara de tuna) y la productividad final del proceso de extracción. La pectina extraída se analizó en: proteína (Kjeldahl), identificación de grupos funcionales (espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)), determinación de ácidos urónicos (Kit enzimático, K-Uronic, Megazyme), pesos moleculares (cromatografía de líquidos de tamiz molecular (HP-SEC)), grado de metoxilación y acetilación (cromatografía de líquidos), identificación y cuantificación de azúcares neutros (cromatografía de líquidos), propiedades reológicas al flujo (reometría de cizalla estacionaria) y propiedades viscoelásticas (reometría de cizalla oscilatoria de baja amplitud). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las variables del proceso de ultrasonido (tiempo, intensidad ultrasónica y temperatura), sobre el rendimiento y la productividad de extracción, y sobre las propiedades macromoleculares de las pectinas extraídas.

Los resultados obtenidos mostraron que se pueden obtener rendimientos iguales o mayores a la extracción convencional (i.e. 51.27 ± 2.43 g_{polisacárido}/kg_{sólidos de cáscara}) con un aumento de 8 a 13 veces en la productividad del proceso. Los análisis de FT-IR y la determinación de grupos metoxilo confirmaron la presencia de polímeros tipo pectina con bajo grado de metoxilación (2 a 25 %mol). El efecto más importante del ultrasonido sobre las propiedades macromoleculares de las pectinas extraídas se observó en los tratamientos con 90% AU, siendo las pectinas extraídas a 60 °C las que presentaron una depolimeración y desmetoxilación en función del tiempo de sonicación. Las disoluciones acuosas de las pectinas extraídas por ultrasonido presentaron un comportamiento no newtoniano

que se ajustó al Modelo de Ostwald-de Waele y Cross. La viscosidad de las soluciones de pectina de tuna disminuyó a medida que aumentó el tiempo de proceso con ultrasonido y la amplitud ultrasónica. Las pectinas extraídas a 90% AU fueron más afectadas en el peso molecular promedio y en el grado de metoxilación. Las propiedades viscoelásticas de pectinas al 1% en presencia de 3 mM CaCl_2 fueron características de geles fuertes en todos los tratamientos.

ABSTRACT

This work is about the high-intensity ultrasound-assisted extraction of pectin from prickly pear peel (*Opuntia albicarpa* S.), using 30% ultrasonic amplitude (AU) at 40 °C and 60 °C, and 90% AU at 60 °C. The ultrasound-assisted extraction was compared with the conventional method reported by Lira-Ortiz et. al. (2014). The parameters evaluated were: the total extraction yield (alcohol insoluble solids/prickly pear peel solids) and the final productivity of the extraction processes. The extracted pectic polysaccharide was analyzed for protein (Kjeldahl method), identification of functional groups (Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy), uronic acids (K-uronic, Megazyme kit), molecular weight (HP-SEC), methoxylation and acetylation degrees (HPLC), neutral sugars (HPLC) and flow and viscoelastic properties. The aim of this study was to evaluate the effect of ultrasound process variables (time, ultrasonic intensity and temperature) on the yield and productivity of extraction processes, and on the macromolecular properties of extracted pectins.

The ultrasound-assisted extraction resulted on comparable or greater total extraction yields than the conventional method (i.e. 51.27 ± 2.43 g_{polysaccharide}/ kg_{peel solids}) with an increase of 8 to 13 times in the final process productivity. The FTIR spectroscopy and the methoxylation analysis confirmed the extraction of low methoxyl pectins (2 to 25% mol of methoxyl groups). The most important effect of the sonication on the macromolecular properties of extracted pectins was observed in the treatment at 90% AU, those pectins showed de-methoxylation and depolymeration with the sonication time. Aqueous solutions of prickly pear pectins showed non-Newtonian behavior which was fit to the Ostwald-de Waele and Cross equations. The viscosities of pectin solutions decreased with the sonication time and ultrasonic amplitude. The viscoelastic properties of prickly pear pectin at 1% w/w, in the presence of 3 mM CaCl₂, were characteristic of strong gels in all treatments.

1. INTRODUCCIÓN

En México, la tuna ha sido muy apreciada por sus cualidades alimenticias y sabor característico. Actualmente se cultiva en gran parte del país, pero 90% de la producción nacional se registra en los estados de México, Zacatecas, Puebla e Hidalgo (SIAP, 2013). De acuerdo a los datos de SAGARPA, en 2012 se obtuvo una producción nacional de 527,627 toneladas de tuna, 34% mayor a lo producido en 2011 (SIAP, 2013). El cultivo de tuna representa una alternativa productiva para la región árida y semiárida de México, debido a la extensa gama de variedades de tuna que existen en el país, lo que representa una ventaja para liderar los mercados internacionales de este producto. Actualmente las organizaciones de productores de tuna trabajan en la producción de nuevas variedades de ésta para ampliar la oferta en los mercados internacionales, principalmente Estados Unidos de América y Europa (ASERCA, 2011).

En los últimos años, diversos estudios han revelado las propiedades nutricionales de la tuna, coincidiendo en reportar que este fruto es una fuente importante de fibra, pigmentos, minerales, antioxidantes y vitamina C (Piga, 2004). Algunos países como Italia, Sudáfrica, Chile, Argentina y Estados Unidos de América han incrementado su producción de tuna, atraídos por las propiedades nutricionales de ésta. Sin embargo, la presencia de una cáscara espinosa en este fruto es aún un factor de rechazo en muchos sectores de la población (ASERCA, 2011). Hasta ahora, los aspectos de aprovechamiento industrial de la tuna han sido poco abordados, la tuna se consume mayoritariamente como fruto fresco. Por ello es necesario desarrollar tecnologías para procesar y ampliar la oferta de productos derivados de la tuna con mayor valor agregado. Entre éstos se puede citar la extracción de polisacáridos estructurales de la cáscara (pectinas, mucílagos, celulosa), los cuales pueden tener propiedades de interés para la industria farmacéutica y de alimentos. En particular, la extracción de pectinas resulta de interés por las propiedades reológicas que imparten estos hidrocoloides a

sistemas alimentarios, en donde se usan como viscosificantes, gelificantes y estabilizantes.

Actualmente, la industria mundial de extracción de pectinas está soportada en los desechos de cítricos, bagazo de manzana y remolacha azucarera, y las grandes empresas productoras de pectinas están ubicando sus plantas en países productores de éstos frutos, dentro de los cuales destacan México y Brasil (Kelco, 2013). Adicional a esta situación, los precios de las pectinas están en continuo ascenso y las grandes empresas de hidrocoloides alimentarios están incorporando pectinas a su lista de productos, debido a su inocuidad y a los efectos positivos de su consumo en la salud del consumidor (Seisun, 2002). No obstante que la industria de las pectinas se ha basado principalmente en los cítricos, nuevas fuentes de éstas con propiedades de interés para la industria de alimentos pueden ser atractivas desde el punto de vista económico, tal es el caso de la tuna, considerando que las pectinas de ésta se encuentran mayoritariamente en la cáscara, la cual hasta ahora no se aprovecha industrialmente.

El estudio de la pectina de tuna es aún incipiente, en Italia, Túnez y Marruecos se han estudiado el nopal y la cáscara de tuna de *Opuntia* spp. como fuentes potenciales de pectinas (Forni, Penci & Polesello, 1994; Majdoub, Roudesli & Deratani, 2001; Habibi, Heyraud, Mahrouz & Vignon, 2004). Se ha reportado la composición y estructura del polímero extraído de la cáscara de tuna, el cual se identificó que consta de bloques de homogalacturonano y bloques de ramnogalacturonanos que forman la región ramificada del polímero, las ramificaciones de este bloque comprenden cadenas de azúcares neutros en donde predominan oligosacáridos de arabinosa y galactosa. En estudios previos realizados en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Lozada-Carbajal, 2007; Lira-Ortiz, 2009) se evaluaron distintas condiciones de extracción de pectinas de cáscaras de tuna (*Opuntia* spp) variedad Alfajayucan a nivel laboratorio y se estandarizó un proceso de extracción de pectinas gelificantes,

obteniéndose rendimientos de 9 al 18% en base seca (Lozada-Carbajal, 2007). Los polisacáridos extraídos de la cáscara de tuna fueron caracterizados químicamente en su perfil de azúcares, contenido de ácido galacturónico y distribución de masas moleculares. Los resultados evidenciaron características químicas de un polisacárido tipo pectina con 65% de ácido galacturónico y con propiedades viscosificantes y gelificantes superiores a las de las pectinas cítricas comerciales (Lira-Ortiz et al., 2014).

Aunque se ha evidenciado el potencial aprovechamiento de la cáscara de tuna para la obtención de polisacáridos tipo pectina, los trabajos concernientes al proceso de extracción y la caracterización fisicoquímica de este nuevo polisacárido aún son incipientes. No obstante, aunque el proceso de extracción no genera residuos contaminantes, éste involucra tiempos largos (>2 h). Por lo tanto, se considera relevante realizar estudios para mejorar la productividad del proceso. En la actualidad, las tecnologías emergentes han demostrado ser adecuadas para mejorar y hacer más eficientes los procesos de producción y extracción de compuestos naturales. Dentro de estas tecnologías destacan el uso de microondas, altas presiones y ultrasonido. En el presente estudio se expone la utilización de ultrasonido de alta intensidad para asistir la extracción de pectina de cáscara de tuna. Con la aplicación de ultrasonido durante el proceso de extracción se disminuyen sustancialmente los tiempos de proceso, incrementando su productividad. En este trabajo se describe también el efecto de las condiciones de extracción (i.e. amplitud ultrasónica y tiempo de ultrasonido) sobre las propiedades macromoleculares de la pectina extraída (peso molecular, composición química, grado de esterificación, propiedades reológicas).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tecnologías emergentes en el procesamiento de alimentos

Hoy en día, existe un particular interés por los alimentos mínimamente procesados. Los consumidores exigen alimentos más sanos; es decir, alimentos menos procesados, con menos conservadores, sin perder de vista que tengan una vida de anaquel más larga y que durante su procesamiento conserven sus propiedades nutricias y sensoriales. En consecuencia, los investigadores han puesto un particular interés en tecnologías novedosas o no convenciones que les permitan desarrollar productos de mejor calidad a un costo menor de proceso. Una solución a estos problemas ha sido la implementación de tecnologías emergentes. Los principales objetivos de estas tecnologías son la reducción del tiempo de procesamiento, el ahorro de energía y la mejora de la calidad y vida de anaquel de los productos alimentarios (Chemat, Zill & Khan, 2011).

Dentro de las tecnologías emergentes que se han desarrollado en los últimos años destacan el uso de radio frecuencia, calentamiento en microondas, altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos, campos magnéticos, ozonización y ultrasonido. Aunque estas tecnologías se han aplicado en procesos alimentarios en países desarrollados, los países en desarrollo deberían beneficiarse del conocimiento ya adquirido en este campo (Ahmed, Ramaswamy, Kasapis & Boye, 2010). En años recientes, el ultrasonido ha generado expectativas en la industria de alimentos, actualmente se disponen de equipos a nivel industrial y esta tecnología se considera sustentable por su bajo impacto ambiental (Chemat et al., 2011).

2.2 Ultrasonido y su aplicación en la industria de alimentos

El sonido, en física, es cualquier fenómeno que involucre la propagación de energía en forma de ondas elásticas (sean audibles o no por el ser humano), generalmente a través de un fluido u otro medio elástico, que genere el movimiento vibratorio de un cuerpo. Para fines prácticos, el sonido puede clasificarse como (Herrero & Romero de Ávila, 2006):

- ✓ Infrasonido (frecuencias < 20 Hz)
- ✓ Audible (20 Hz – 20 kHz)
- ✓ Ultrasonido (frecuencias > 20 kHz)

Existen dos formas de aplicación del ultrasonido en alimentos: baja y alta intensidad. La primera categoría se caracteriza por frecuencias mayores a 100 kHz con energías inferiores a 1 W/cm². El ultrasonido de baja intensidad no causa efectos significativos en el material de prueba y en alimentos se usa como herramienta analítica para control de procesos o para obtener información de propiedades fisicoquímicas como la evaluación de burbujas de aire en alimentos aireados, contenido de grasa en productos cárnicos, caracterización de la calidad del huevo, coagulación de la leche, control de la fermentación del vino y caracterización de masas de panificación (Povey, 1989; McClements, 1997; Benedito, Carcel, González & Mulet, 2002; Simal et al., 2003; Resa et al., 2007; Álava et al., 2007). En estas aplicaciones los parámetros a controlar son la medición de la velocidad del ultrasonido, la atenuación de la señal y el análisis de los espectros de frecuencia.

Por otra parte, el ultrasonido de alta intensidad hace uso de frecuencias menores a 100 kHz con energías superiores a 10 W/cm². Sus aplicaciones causan efectos en el material por la intensa cavitación que se genera (Salazar, Chávez, Turó & García-Hernández, 2010). Este tipo de ultrasonido ha sido usado con éxito para mejorar algunos procesos o productos alimentarios. Algunas de sus aplicaciones en la industria de alimentos están relacionadas con los procesos de maceración, congelación, extracción de compuestos naturales, modificación de ingredientes, depolimeración de algunos polisacáridos o gomas, procesos de sustitución de azúcar, en fermentaciones, pasteurización de leche, entre otros. En el Cuadro 1 se describen algunos de estos procesos.

Algunos autores afirman que por medio de las vibraciones mecánicas de alta intensidad, el ultrasonido es capaz de alterar la estructura del alimento y promover ciertas reacciones químicas que pudieran ser utilizadas a favor o en contra del proceso. La gama de aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad en la industria de los alimentos es amplia y está incrementando rápidamente. Algunos ejemplos incluyen la emulsificación, el secado, la desgasificación, modificación de la viscosidad y la inactivación de microorganismos. El uso de esta tecnología ofrece algunas ventajas valiosas tales como mayor productividad, rendimiento y selectividad, así como un menor tiempo del proceso, una mejor calidad del producto final, reducción de riesgos químicos o físicos al utilizar otras técnicas y es más amigable con el medio ambiente al no generar desechos industriales peligrosos (Patist & Bates, 2008; Soria & Villamiel, 2010; Chemat et al., 2011; Esclapez, García-Pérez, Mulet & Cárcel, 2011; Chandrapala, Oliver, Kentish & Ashokkumar, 2012).

Cuadro 1. Aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad en procesos alimentarios (Chemat et al., 2011; Salazar et al., 2010).

Cocción	Estufa, freidor, baño maría, etc.	Trasferencia de calor uniforme.	Menos tiempo de proceso, mejorar la transferencia de calor y las características organolépticas.	Carne y vegetales.
Cristalización durante congelación	Congelado, congelado por inmersión, etc.	Trasferencia de calor uniforme.	Menos tiempo de proceso, cristales más pequeños, promueve la difusión, decremento rápido de la temperatura.	Carne, vegetales, frutas y productos lácteos.
Secado	Atomización, secado por aspersion, etc.	Trasferencia de calor uniforme.	Menos tiempo de proceso, promueve una mejor calidad organoléptica y transferencia de calor.	Productos deshidratados (frutas, vegetales, etc.).
Macerado o marinado	Inmersión en salmuera	Incrementa la transferencia de calor.	Menor tiempo de proceso, promueve una mejor estabilidad y calidad organoléptica.	Vegetales, carne, pescado y queso.
Desgasificación	Tratamientos mecánicos.	Compresión y fenómeno de rarefacción.	Proceso en menor tiempo y mayor higiene.	Chocolate y productos fermentados (cerveza, etc.).
Filtración	Filtros.	Vibraciones.	Menor tiempo de proceso y mejor filtración.	Líquidos (jugos, etc.)
Desmolde	Moldes engrasados, moldes de teflón, moldes de silicón.	Vibraciones.	Proceso en menor tiempo y menor pérdida de producto.	Productos horneados (galletas, etc.)
Evitar la formación de espuma	Tratamientos térmicos, químicos, eléctricos y mecánicos.	Fenómeno de cavitación.	Proceso en menor tiempo y mayor higiene	Bebidas carbonatas o fermentadas.
Mejorar la emulsión	Tratamientos mecánicos	Fenómeno de cavitación.	Emulsión estable, proceso más rápido.	Emulsiones (salsa catsup, mayonesa, etc.)
Pasteurización e inactivación enzimática	Tratamientos térmicos	Fenómeno de cavitación,	Dstrucción de microorganismos e inactivación enzimática a bajas temperaturas.	
Tenderización de la carne	Acción enzimática		Aumento de la sensibilidad por la ruptura de los componentes miofibrilares en períodos más cortos de envejecimiento	
Oxidación	Contacto con aire.	Fenómeno de cavitación.	Acelera el proceso.	Bebidas alcohólicas (vinos, whisky, etc.)

2.2.1 Cavitación

Se han reportado varios mecanismos que pueden ser activados por el ultrasonido de alta intensidad o “ultrasonido de potencia”, tales como calentamiento, turbulencia, agitación, fricción, inestabilidad superficial y otros. Aunque no todos están bien estudiados, la mayoría de ellos se puede atribuir a un fenómeno no lineal y muy complejo conocido como “cavitación”. El fenómeno de la cavitación se reportó por primera vez en 1895 por Thornycroft y Barnaby (Salazar et al., 2010), cuando determinaron que el bajo rendimiento de un nuevo torpedo fue la ineficiencia y pérdida de potencia causada por la formación de cavidades en el agua.

Actualmente se reconocen los efectos de ondas de ultrasonido que se propagan en medios líquidos. Estos efectos surgen de procesos físicos que crean, alargan o generan implosión de cavidades gaseosas en un líquido (Suslick, 1989). Las ondas de ultrasonido, como todas las ondas del sonido, consisten de ciclos de expansión y compresión. Durante los ciclos de expansión, una onda de sonido de suficiente intensidad puede generar cavidades en el líquido, para que esto se logre, las presiones de vacío asociadas con el ciclo de expansión deben vencer a la tensión interfacial del líquido (Figura 1). Sin embargo, la tensión interfacial de los líquidos disminuye con la presencia de gas atrapado en ellos o en partículas sólidas suspendidas (Suslick, 1989).

Actualmente se reporta que cuando la potencia del ultrasonido aumenta, se presentan cambios químicos y físicos en el medio líquido por la generación y posterior destrucción de burbujas de cavitación. Cuando un líquido se somete a ultrasonido con suficiente potencia, el líquido se comprime y se expande, formando pequeñas burbujas o cavidades (Figura 1). Estas burbujas crecen y se encogen con los ciclos de expansión y compresión de la onda ultrasónica, cuando alcanzan un tamaño crítico explotan. El colapso de estas burbujas puede ser tan

violento, que puede causar daños considerables al medio circundante. Suslick (1989) reportó que los vapores y gases dentro de las cavidades se comprimen, generando calor intenso que da lugar a un incremento importante de la temperatura del líquido que rodea a la cavidad, lo cual genera “puntos calientes” en el líquido. Suslick estimó temperaturas cercanas a 5500 °C dentro de la cavidad y alrededor de 2100 °C en el líquido que rodea la cavidad; mientras que la presión máxima estimada fue de 500 atmósferas (Suslick, 1989), lo cual ocurre en tiempos menores a un microsegundo. Este calentamiento o “puntos calientes” pueden conducir a reacciones químicas en la interfase líquido-gas o sólido-gas, si el líquido donde se propaga el ultrasonido contiene partículas sólidas. Cabe señalar que este calor es transitorio y se da a pequeña escala, por lo que se disipa rápidamente y el aumento global de temperatura en el medio líquido es relativamente bajo (Suslick, 1989).

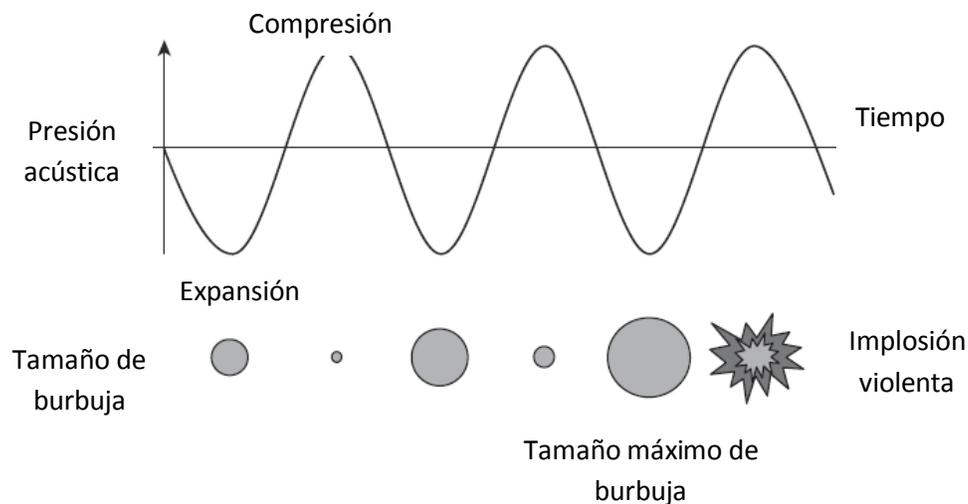


Figura 1. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido de alta intensidad (adaptado de Salazar et al., 2010).

La cavitación genera también radicales libres debido a la disociación del vapor atrapado en las burbujas de cavitación, lo cual intensifica reacciones químicas o altera mecanismos de reacción. Otro efecto de la cavitación es la formación de turbulencia local y micro-circulación del líquido en el reactor o recipiente contenedor, lo cual favorece los mecanismos de transporte, principalmente disminuye la resistencia a la transferencia de masa en sistemas heterogéneos (Gogate & Kabadi, 2009). Con base en el grado de intensidad, la cual se puede describir en términos de la magnitud de la presión o temperatura, la cavitación puede distinguirse como transitoria o como estable. La cavitación transitoria es un proceso donde la cavidad o burbuja eventualmente colapsará en fracciones de minuto, en ese momento el gas presente en ella se disipará en el líquido circundante de forma violenta, liberando una cantidad importante de energía en forma de onda de choque acústico. Por otra parte, la cavitación estable o no-inercial, comprende burbujas pequeñas que son forzadas a oscilar en tamaño y forma por las ondas acústicas presentes; sin embargo, el campo acústico no es suficiente para colapsarlas, por lo tanto los efectos son menores a los generados por la cavitación transitoria (Gogate & Kabadi, 2009).

2.3 Extracción de polisacáridos asistida por ultrasonido

En alimentos, la extracción de compuestos naturales es de interés principalmente por las propiedades funcionales o nutraceuticas de estos extractos. Los procesos de extracción se han centrado principalmente en compuestos vegetales. Las plantas contienen una amplia gama de compuestos bioactivos tales como lípidos, fitoquímicos, sabores, fragancias, pigmentos, polisacáridos, etc., que son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética. El interés en estos compuestos ha llevado a una creciente necesidad de mejores métodos de extracción para incrementar el rendimiento de extracción de

componentes bioactivos en menores tiempos de procesamiento y costos. Existen diversas técnicas de extracción, como la maceración, digestión, infusión, decocción, filtración, extracción continua a temperatura elevada, extracción con fluidos supercríticos, asistida con microondas y extracción asistida con ultrasonido. Las principales diferencias entre estas técnicas están relacionadas con el diseño de los reactores, los disolventes utilizados, el tiempo y la temperatura de los procesos, o el uso de tecnologías no convencionales (*i.e.* microondas, ultrasonido, fluidos supercríticos, pulsos eléctricos, entre otras).

Los métodos convencionales de extracción líquido-sólido son laboriosos, consumen mucho tiempo y con frecuencia requieren grandes volúmenes de disolventes orgánicos. Hoy en día, la tendencia es utilizar disolventes menos contaminantes, tales como mezclas de alcohol-agua, aumentando así los costos y bajando el rendimiento de extracción. Por lo que ha surgido un interés particular para el desarrollo de métodos de extracción más eficientes. Una técnica alternativa es la extracción supercrítica, la cual usa fluidos en estado supercrítico que al poseer una densidad intermedia entre un gas y un líquido, tiene un poder disolvente mayor que el de solventes comerciales. Sus propiedades de transporte, como una viscosidad menor y una difusividad superior, favorecen mayores rendimientos de extracción por penetrar en materiales sólidos porosos con mayor eficacia que los disolventes líquidos. El fluido más usado en extracciones supercríticas es el dióxido de carbono, debido a su baja temperatura y presión supercrítica, y su carácter casi inerte (Esclapez et al., 2011).

Otra técnica de extracción no convencional es la extracción asistida por ultrasonido (USAE, por sus siglas en inglés), es un proceso que ha adquirido interés particular en la comunidad científica mundial. En los últimos 30 años el número de publicaciones de USAE ha crecido de forma importante (Figura 2), particularmente a partir del 2002 (Esclapez et al., 2011). Esta tecnología ha

resultado de interés para obtener antioxidantes de fuentes vegetales, proteínas, azúcar, almidones, aceites, sabores y fragancias (hierbabuena, lavanda, vainilla, etc.). Entre las ventajas de esta tecnología de extracción se puede mencionar el mejoramiento en la eficiencia de la extracción, son procesos más rápidos, se puede reducir la temperatura del proceso y se favorece la disolución de los compuestos de interés. Si el proceso se lleva a cabo a temperaturas altas (ejemplo en la extracción de compuestos no volátiles y/o no termolábiles), se mejora la solubilidad de los analitos en el disolvente y se facilita su difusión desde la matriz de la muestra al medio líquido exterior. Por otro lado, el aumento de la presión local (debida al choque de las ondas ultrasónicas) facilita tanto la penetración del disolvente en la matriz de la muestra como el proceso de transporte de los compuestos de interés. Además, la implosión de las burbujas de cavitación puede golpear la superficie de la matriz sólida y desintegrar células vegetales en procesos de extracción de productos naturales (Figura 3), como consecuencia de estos efectos, la extracción se realiza en menos tiempo que en los procesos de extracción convencionales (Veillet, Tomao & Chemat, 2010). En la Cuadro 2 se resumen algunos de los trabajos de extracción de productos naturales con asistencia de ultrasonido.

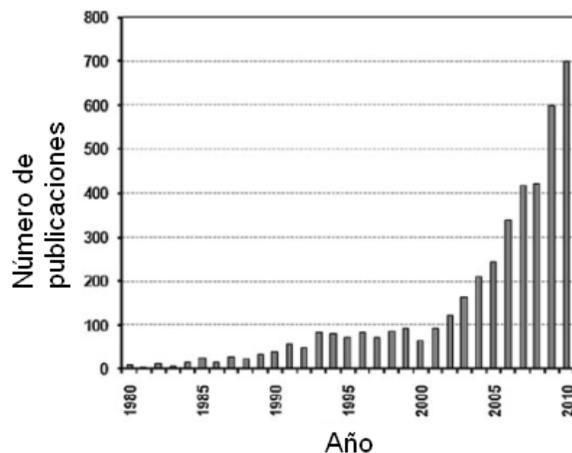


Figura 2. Número de artículos publicados de extracción asistida por ultrasonido en los últimos 30 años (Fuente: www.sciencedirect.com; extraída de Esclapez et al., 2011).

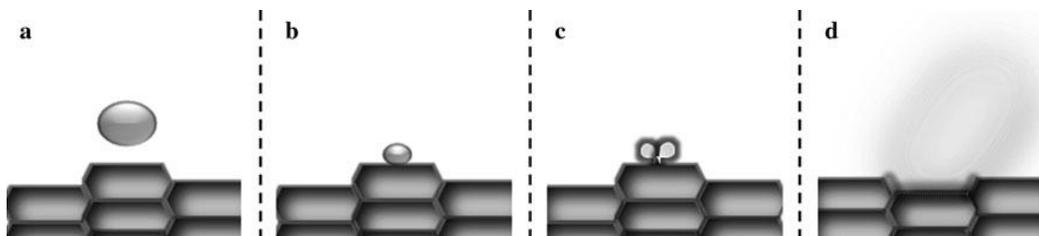


Figura 3. Representación esquemática de la rarefacción (a) y el ciclo de compresión (b) de una burbuja de cavitación que eventualmente colapsa cerca de la interfaz líquido/tejido biológico, generando ondas de choque y *microjets* (c) que pueden alterar la pared celular liberando el material intracelular en la solución (d) (Esclapez et. al., 2011).

Roldán-Gutiérrez, Ruiz-Jiménez & Luque de Castro, (2008) mostraron que para la extracción de compuestos valiosos a partir de plantas aromáticas y flores, la extracción asistida con ultrasonido (USAE) fue 45 a 12 veces más rápida que la extracción convencional y de 9 a 2 veces más rápida que la extracción con agua supercrítica. Uno de los inconvenientes de la USAE, en comparación con la extracción con fluidos supercríticos, es el uso ocasional de disolventes orgánicos, los cuales pueden ser contaminantes, pero el equipo es más sencillo y el costo del proceso es menor. En conclusión, las principales ventajas de la USAE es que es más eficaz, ahorra energía y se puede usar a temperaturas moderadas, lo cual es beneficioso para compuestos termolábiles, y aunque usa solventes, la cantidad de éstos frecuentemente es menor a la usada en extracciones convencionales, las cuales son laboriosas y requieren mayor tiempo de extracción. En la Cuadro 3 se presentan los trabajos más representativos de extracción de polisacáridos con asistencia de ultrasonido.

Cuadro 2. Aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad en procesos extracción de compuestos naturales (Esclapez et al., 2011).

Extracto	Fuente	Frecuencias (kHz)	Π (W/cm ³)	t (min)	T (°C)	Relación extracto/solvente	Equipo	Rendimiento de la extracción
Carbohidratos totales	Stevia	20	0.06	32	68	100 g/L	Sonda ultrasónica	17 g/100 g
Flavonoides	Cáscara de cítricos	60	NR	30	40	1 g /10 mL	Baño ultrasónico	40 mg/g
Catequina	Pomaza de manzana	24	0.142 W/g	45	40.1	15 g/100 mL	Baño ultrasónico	964 mg/100 g
Ácidos cinámicos	Cáscara de cítricos	60	0.02	40	30	2 g/40 mL	Baño ultrasónico	NR
Acido Benzoico	Cáscara de cítricos	60	0.02	10	40	2 g/40 mL	Baño ultrasónico	NR
Proteínas	Trigo sin grasa	20	7.26	24	Hielo	0.5 g/50 mL	Sonda ultrasónica	57%
Fosfatidiletanolamina	Extracto de palma	24	1.53	30	25	15 g/60 mL	Sonda ultrasónica	12,570 mg/kg
Fosfatidilcolina	Extracto de palma	24	1.53	30	25	15 g/60 mL	Sonda ultrasónica	5,426 mg/kg
Vainilla	Vainas de Vainilla	22.4	2.40	60	NR	0.5 g/100 mL	Sonda ultrasónica	140 ppm en lixiviados
Compuestos fenólicos	Salvado de trigo	40	0.025	25	60	5 g/100 mL	Baño ultrasónico	3.12 mg
Aceite	Linaza	20	50 W	30	30	16.7 g/100 mL	Sonda ultrasónica	85% en soxhlet
Capsaicina	Pimentón	NR	360 W	10	50	1 g/25 mL	Baño ultrasónico	448 μ mol/kg
Capsaicina	Bolilla Redondo	NR	360 W	10	50	1 g/25 mL	Baño ultrasónico	370 μ mol/kg
Capsaicina	Bolilla Largo	NR	360 W	10	50	1 g/25 mL	Baño ultrasónico	275 μ mol/kg

Π : intensidad de ultrasonido; t: tiempo de proceso, T: temperatura; NR: no reportado;

Cuadro 3. Estudios del ultrasonido de alta intensidad en extracción de polisacáridos.

Material a extraer	Potencia	Generador de ultrasonido	Frecuencia (kHz)	Tiempo	Relación H ₂ O/extracto mL/g	Temperatura (°C)	Rendimiento óptimo (método convencional)	Rendimiento óptimo (ultrasonido)	Condiciones óptimas (ultrasonido)	Referencias
Producción de pectinas de bajo grado de esterificación	I ≈ 1.2-1 W/cm ²	Sonda ultrasónica	22	30 y 60 min	NR	40, 50 y 60	9.0%	10.8%	30 min y una temperatura de 40-60 °C.	(Panchev et al., 1994)
Polisacáridos medicinales de raíz de valeriana	600 W I= 1 W/cm ²	Desintegrador ultrasónico con bocina 79 cm de largo y 5 cm de diámetro.	20	2 h	NR	NR	11.9%	11.5%	Sólo se usó una condición.	(Hromádková, Ebringerová & Valachovic, 2002)
Hemicelulosa de cáscara de trigo	100 W I≈8W/cm ²	Sonda ultrasónica	20	5 y 10 min	NR	40 y 60	8.3-11.2% en 60 min	16.5%	60 °C y 10 min.	(Hromádková & Ebringerová, 2003)
Xiloglucanos de pomaza de manzana	160 W	Baño ultrasónico	59	0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 h.	25:1, 30:1, 35:1, 40:1 y 45:1	NR	NR	3 veces más rápido que la convencional	34.4 relación H ₂ O/extracto, 2.5 h y 3.3 M KOH.	(Caili, 2006)
Heteroxilanos de salvado de trigo	100 W I=8 W/cm ²	Sonda ultrasónica (20 mm diámetro y 120 mm largo)	20	5 y 10 min	10:1 (0.5, 2 y 5% NaOH)	40 y 60	NR	NR	El uso de ultrasonido disminuyó el uso de NaOH y se obtuvieron rendimientos mayores usando ultrasonido durante tiempos menores a 10 min.	(Hromádková, Košťálová & Ebringerova, 2008)
Polisacáridos pécticos de semilla de calabaza	100 W I≈8 W/cm ²	Sonda ultrasónica	NR	5 y 10 min	52:1 y 70:1	35	22.4% en 60 min.	22.9%	5 min, relación 70:1 mL/g.	(Košťálová, Hromádková & Ebringerová, 2010)
Pectinas de toronja	200 W	Sonda ultrasónica	24	4, 12, 15, 20 y 30 min	NR	50, 60, 70 y 80	19.16% en 90 min.	17.92%	25 min, 70 °C.	(Bagherian, Zokaee Ashtiani, Fouladitajar & Mohtashamy, 2011).
Polisacáridos medicinales de semillas de Litchi	120, 210 y 300 W	NR	NR	5, 25 y 45 min	5:1, 10:1 y 15:1	NR	NR	NR	222 W, 45 min y 15:1 relación solvente/extracto.	(Chen, Luo, Gao & Zhu, 2011)
Inulina	20-100 % AU	Sonda ultrasónica	25	5-25 min	NR	20-60	NR	NR	83.22 % AU, 25 min y 36.76 °C	(Milani, Koocheki & Golimovahhed, 2011)

Cuadro 3. Estudios del ultrasonido de alta intensidad en extracción de polisacáridos (continuación).

Material a extraer	Potencia	Generador de ultrasonido	Frecuencia (kHz)	Tiempo	Relación H ₂ O/extracto mL/g	Temperatura (°C)	Rendimiento óptimo (método convencional)	Rendimiento óptimo (ultrasonido)	Condiciones óptimas (ultrasonido)	Referencias
Polisacáridos antioxidantes de hongos blancos, <i>Agaricus bisporus</i>	160-320 W	Limpiador ultrasónico (KQ-400KDV)	25	20-100 min.	20:1, 25:1, 30:1, 35:1 y 40:1.	60, 65, 70, 75 y 80	2.36%	5.88%	230 W, 70 °C, 64.4 min y 30:1.	(Tian et al., 2012)
β-glucanos de cebada	400 W	Sonda ultrasónica	24	3, 10 y 17 min.	10:1	55	NR	66.1%	El uso de ultrasonido mejora el tiempo de proceso y usa menor cantidad de energía.	(Benito-Román, Alonso & Cocero, 2013)
Polisacáridos de hongos medicinales	130 y 900 W	2 diferentes generadores de sonda ultrasónica	20	10, 20, 40, 55, 70 y 80 min.	30:1, 50:1 y 70:1.	40, 55 y 70.	8.5%	18%	80 min, 44.1 W/cm ² , 70 °C y 1:30.	(Cheung & Wu, 2013)
Mucilagos de <i>Salvia macrosiphon</i>	30-150 W	Generador ultrasónico	20	1, 5.75, 10.5, 15.75 y 20 min.	NR	5, 18.75, 25.6, 32.5 y 46.25.	12.35%	16.66%	150 W, 20 min y 5 °C.	(Farahnaky et al., 2013)
Polisacáridos de calabaza (<i>Cucurbita moschata</i>)	50-70 W	Generador ultrasónico	20	10, 15, 20, 25 y 30 min.	5:1, 10:1, 15:1, 20:1 y 25:1.	40, 50, 60 y 70.	NR	16.04%	70 W, 23 min y 1:10.	(Prakash Maran, Mekala & Manikandan, 2013)
Polisacáridos del cabello de elote	250 W	Limpiador ultrasónico	40	10 - 30 min.	10:1 – 30:1.	40 - 60.	NR	6.06%	56 °C, 17 min y 1:20.	(Prakash Maran, Manikandan, Thirugnanasambandham, Vigna Nivetha & Dinesh, 2013)
Arabinosilanos de salvado de trigo	100-300 W	Tanque ultrasónico	NR	40 – 100 min.	30 - 60 g/L	40 – 60.	NR	14.26%	50 °C, 70 min, 180 W y 50 g/L.	(Wang, Sun, Liu & Zhang, 2014)
Pectina de toronja	30-80 W	Sonda ultrasónica	20	10, 20, 30, 40, 50 y 60 min.	30:1, 46:1, 50:1, 60:1 y 70:1.	30, 40, 50, 60, 70 y 80.	23.44%	26.74%	70 W, 60 °C, 52 min y 50:1.	(Xu et al., 2014)

NR=no reportado, AU=amplitud ultrasónica.

En el Cuadro 3, se muestra de forma resumida los trabajos realizados en los últimos años que reportan extracciones de polisacáridos usando ultrasonido de alta intensidad como tecnología emergente. Normalmente encontramos dos vertientes en las conclusiones de estos trabajos, la primera y más común, es que los procesos de extracción con ultrasonido son más rápidos, emplean menor energía y se obtienen los mismos rendimientos que la extracción convencional (Bagherian et al., 2011; Benito-Román et al., 2013; Caili et al., 2006; Hromádková, Ebringerová, A. & Valachovic, P., 2002; Hromadkova et al., 2008). En la segunda vertiente encontramos que en los procesos extraídos con ultrasonido además de lo anteriormente mencionado, se obtienen rendimientos mayores a los obtenidos a la extracción convencional (Cheung & Wu, 2013; Farahnaky et al., 2013; Hromádková & Ebringerová, 2003; Panchev et al., 1994; Tian et al., 2012; Xu et al., 2014).

Panchev et al. (1994), reportaron que la utilización de ultrasonido puede ayudar a los procesos de extracción de polisacáridos de interés, como es el caso de las pectinas debido a dos efectos, primero; al producirse el fenómeno de cavitación se promueve la ruptura celular que permite la liberación de los compuestos de interés y segundo, debido a la misma ruptura celular, se promueve una mayor área de contacto entre el solvente y el material orgánico, promoviendo una mayor transferencia de masa en la capa límite que rodea a la matriz sólida, por lo que el rendimiento puede ser mayor.

Por otra parte, gran parte de estos estudios están enfocados en determinar los rendimientos óptimos de la extracción asistida con ultrasonido, pero existen otros trabajos que reportan el efecto del ultrasonido sobre las propiedades macromoleculares y funcionales que pudiera tener el fenómeno de cavitación sobre estos polisacáridos, siendo la depolimeración el principal efecto del ultrasonido sobre esta moléculas.

La depolimeración ha sido observada por Zhang et al. (2013a), quienes al someter soluciones de pectina de manzana a ultrasonido de alta intensidad, observaron que la depolimeración es mayor a medida que se aumenta la amplitud ultrasónica y el tiempo. Por otra parte, Grönroos, Pentti & Hanna (2008), establecieron que la exposición prolongada de las soluciones macromoleculares a las ondas ultrasónicas produce la depolimeración debido a las fuerzas hidrodinámicas y además, que la viscosidad, la masa molecular y la concentración de polímero son factores importantes para que la depolimeración suceda con mayor velocidad o ésta implique una mayor disminución del peso molecular.

En otro estudio (Czechowska-Biskup, Rokita, Lotfy, Ulanski & Rosiak, 2005), evaluaron el efecto del ultrasonido de alta intensidad sobre la degradación de soluciones de quitosano y almidón, demostrando que la depolimeración de estos depende de la concentración de polímero, la potencia ultrasónica y el gas disuelto en la solución, estos dos últimos están estrechamente relacionados con el fenómeno de cavitación que genera fuerzas capaces de destruir las cadenas poliméricas y formar radicales libres que provocan la ruptura de las cadenas principales por reacciones secundarias con el enlace glucosídico de los azúcares formando grupos carbonilo. Por otra parte, estas reacciones secundarias de los radicales libres y polisacáridos se ven afectadas por la conformación de la cadena principal, siendo más susceptibles las cadenas lineales como el caso del quitosano y menos eficaces en cadenas enrolladas como el caso del almidón.

2.4 Variables a considerar en el uso de ultrasonido para la extracción de polisacáridos y compuestos naturales.

Para que el proceso de extracción con ultrasonido se lleve a escala industrial, es necesario tener en cuenta la influencia de las siguientes variables: la potencia ultrasónica, la frecuencia, la temperatura, el diseño del reactor, los disolventes, la relación disolvente-muestra, el tamaño de las partículas y el tipo de estructura del material. Dichas variables permiten la identificación de los factores de escala necesarios para poder transferir las condiciones experimentales de escala laboratorio a escala industrial. Además, es necesario considerar que en los procesos de extracción, el objetivo principal del proceso no siempre es alcanzar los rendimientos más grandes de extracción, sino tener el consumo más bajo de energía y reducir los costos del proceso (Esclapez et al., 2011).

2.4.1 Potencia de ultrasonido

La medición de la energía acústica real aplicada en un proceso, es bastante difícil de determinar y a menudo no se reporta. A veces, teniendo en cuenta los diferentes niveles de potencia del dispositivo ultrasónico usado, los autores reportan los valores de potencia aplicada como "x% de la capacidad total de energía eléctrica", esto no es una medición exacta. De hecho, en la mayoría de los casos se llegan a conclusiones erróneas o resultados irreproducibles, ya que la potencia ultrasónica no es proporcional a la potencia eléctrica (Esclapez et al., 2011).

Existen varios métodos reportados en la literatura para la estimación de la potencia acústica real en un proceso, estos métodos se basan en la medición de cambios físicos o químicos que ocurren en solución debidos al ultrasonido. Entre los métodos físicos más representativos están el uso de hidrófonos (Martin & Law,

1983) o microscopios ópticos, el método de papel de aluminio (Chivate & Pandit, 1995) y el método de calorimetría (Margulis & Margulis, 2003). En el caso de los métodos químicos, éstos se basan en la estimación indirecta de los radicales OH formados por la cavitación, o en su defecto, cuantificación de algún subproducto formado por la reacción de los radicales OH. Estos productos o subproductos se pueden cuantificar fácilmente por UV-vis o fluorometría al reaccionar por ejemplo con luminol, yodo, fenolftaleína, nitrofenol entre otros (Esclapez et al., 2011).

Aun conociendo la energía ultrasónica efectiva, es difícil comparar sus efectos entre distintos trabajos si en éstos se usaron diferentes volúmenes de operación o distintas geometrías del reactor, por lo que indicar en un experimento sólo la potencia usada no es suficiente. Recientemente, algunos autores como Escalpez et al. (2011) han sugerido indicar la densidad de potencia ($P; W/cm^3$), sobre todo para baños ultrasónicos donde el volumen puede variar notablemente y donde éste no se reporta en la mayoría de trabajos de investigación.

2.4.2 Frecuencia

El papel que juega el ultrasonido sobre la extracción de compuestos naturales, está relacionado principalmente con el fenómeno de cavitación, cuanto menor sea la frecuencia mayor será la formación de burbujas explosivas durante el fenómeno de cavitación ($\approx 20kHz$), por consiguiente será más eficaz la extracción. Cabe señalar que el fenómeno de cavitación, además de ser influenciado por la frecuencia también es afectado por la temperatura, por lo que el efecto de la cavitación sobre la extracción debe ser discutido en función de todas las variables que afectan la cavitación, incluidas la frecuencia y la temperatura. Por otra parte, la frecuencia influye fuertemente en la transferencia de masa, sin embargo, este fenómeno no está muy estudiado en los procesos de extracción y pocos estudios se han enfocado en el secado con ultrasonido (Esclapez et al., 2011).

2.4.3 Temperatura

Puesto que la temperatura afecta a las características físicas y químicas de un producto y los efectos del ultrasonido están vinculados a las características del producto, la temperatura parece ser un factor clave en la extracción asistida con ultrasonido. Esto es especialmente cierto, si algunos compuestos son sensibles a la temperatura o volátiles. En algunos casos se han reportado menores rendimientos de productos volátiles al aumentar la temperatura a más de 45°C. Por lo tanto, al usar temperaturas por encima del óptimo podría dar lugar a la aceleración de la volatilización del disolvente, el aumento de los costos de energía y la obtención de más impurezas durante la extracción (Esclapez et al., 2011). Por otra parte, el aumento de la temperatura de extracción permite un aumento de la transferencia de masa. No obstante, el aumento de la temperatura produce menos cavitación debido a la disminución de la tensión superficial y el aumento de la presión de vapor. Sin embargo, por lo general, el aumento observado en el rendimiento de extracción puede estar relacionado con el incremento de la difusión del disolvente en las células, permitiendo una mejor solubilidad de los componentes a extraer (Kuijpers, Kemmere & Keurentjes, 2002).

2.4.4 Características del reactor

El diseño del reactor es un factor importante a tener en cuenta. Así, en los primeros años de la aplicación del ultrasonido, los experimentos se realizaron en matraces abiertos sumergidos en baños ultrasónicos y se pudo observar la importancia de la geometría del reactor en la reproducibilidad de los resultados. Los avances en la construcción de generadores acústicos han permitido el uso de transductores que se sumergen directamente en la solución a granel. Esta técnica permite que mayor energía se transmita en el medio, pero aumenta la probabilidad de que las muestras puedan estar contaminadas con materiales no deseados (principalmente compuestos obtenidos por la degradación del material a sonicar).

En este enfoque, es necesario considerar la compatibilidad química y física de todos los materiales y productos químicos implicados (Esclapez et al., 2011 y Weissler, Cooper & Snyder, 1950).

En otros casos se ha visto que la longitud de la sonda respecto a la altura de la solución es muy importante. En aquellos casos donde exista una diferencia pronunciada entre la longitud de la sonda y la altura del líquido en el reactor, la transferencia de la energía no será homogénea, esto sucede con mucha frecuencia en los baños ultrasónicos donde la altura de los equipos no siempre suele ser la misma (Kanthale et al., 2003).

2.4.5 Interacción disolvente-muestra

Se debe prestar atención a la elección apropiada del disolvente, porque el disolvente óptimo para extracciones tradicionales puede no ser la mejor opción para la extracción asistida con ultrasonido. La selección del disolvente se basa generalmente en la consecución de una alta afinidad molecular entre el disolvente y soluto, pero los factores que afectan a la cavitación como la presión de vapor o la tensión superficial, deben ser considerados. A altas presiones de vapor, el disolvente se volatiliza llegando a las burbujas de cavitación generando un efecto amortiguador durante su explosión. En este sentido, el mezclar los disolventes con agua podría funcionar mejor que los tradicionales disolventes volátiles puros utilizados para la extracción convencional (Li et al., 2004). El rendimiento de extracción puede ser afectado por el tamaño de partícula, debido a que el proceso de extracción siempre es dependiente del área interfacial disponible para la extracción.

2.5 Pectinas

2.5.1 Estructura química de las pectinas

Las pectinas son los polisacáridos más abundantes en la pared celular de muchas plantas superiores. Éstas se localizan en la lámina media donde regulan la adhesión intercelular, donde también influyen en el crecimiento, desarrollo y envejecimiento de las plantas. Las pectinas tienen un papel importante en la formación de paredes celulares de las plantas superiores, proporcionando fuerza y soporte a la planta. En general, la composición polimérica de las paredes celulares primarias de las plantas dicotiledóneas consiste de aproximadamente 35% pectina, 30% celulosa, 30% hemicelulosa y 5% proteína. En las paredes celulares de algunas frutas y vegetales, el contenido de pectina puede ser sustancialmente mayor y el contenido de proteína, menor (Voragen, Coenen, Verhoef & Schols, 2009). Las pectinas son importantes en el transporte iónico de la pared celular de las plantas, es bien conocido que los oligosacáridos de pectina, activan la respuesta de defensa de las plantas (inducen la acumulación de fitoalexinas, lignificación y la acumulación de inhibidores de proteasas) (Voragen et al., 2009).

El término *pectina* describe a un heteropolisacárido, compuesto principalmente de cadenas de α -(1-4)-D-ácido galacturónico con inserciones de azúcares neutros (galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa, glucosa, fucosa, apiosa). En la estructura de la pectina se reconocen dos zonas, la conocida como zona lisa, “*smooth region*”, y la zona pilosa o ramificada, “*hairy region*”, en esta última se localiza la mayoría de los azúcares neutros (De Vries et al., 1983). La estructura de la pectina es muy diversa, se cree que probablemente sea la macromolécula más compleja de la naturaleza, por estar conformada por más de 17 diferentes monosacáridos unidos a través de más de 20 diferentes tipos de enlaces (Voragen et al., 2009) (Figura 4).

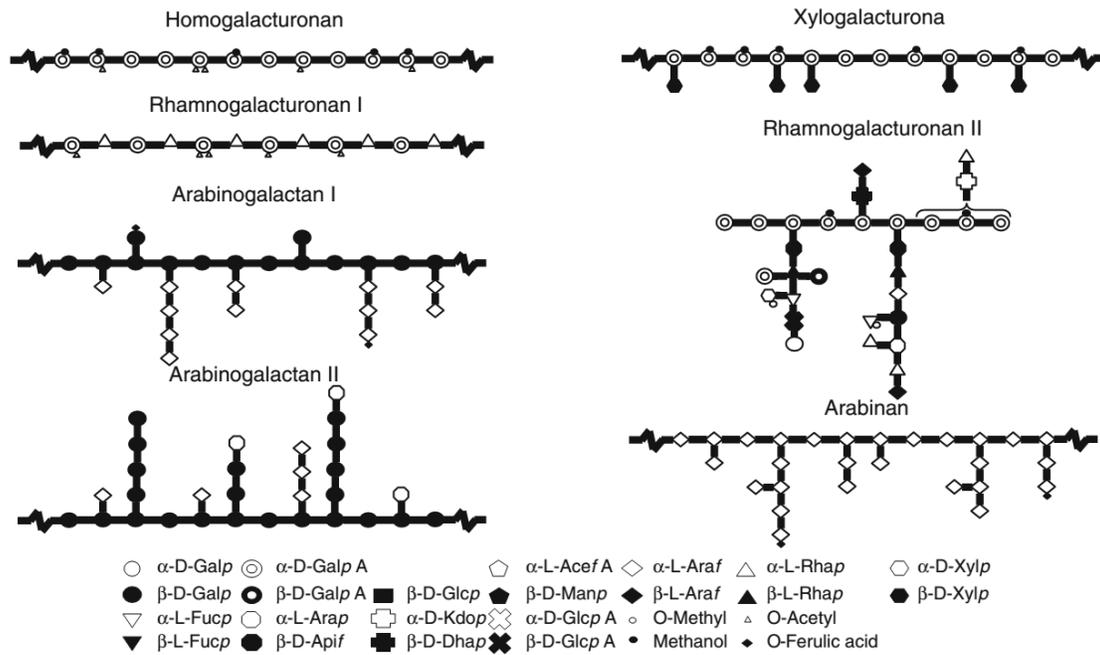


Figura 4. Representación esquemática de los elementos estructurales de pectinas (Voragen et al., 2009).

Hasta los años 90 del siglo pasado se aceptaba que la molécula de pectina era básicamente una molécula lineal de ácido poligalacturónico. Sin embargo, en los últimos años han surgido varios modelos de la estructura química de esta macromolécula. El modelo de Ramnogalacturano establece que la estructura principal de la pectina está compuesta de cadenas de residuos de α -1,4-galacturónidos intercalados con residuos de ramnosa, en donde alrededor de la mitad de las ramnosas están sustituidas con cadenas de galactosa (Voragen et al., 2009). El Modelo de regiones lisas y pilosas (De Vries et al., 1983) establece que la distribución de azúcares neutros es discontinua en pectina de manzana. Todos los azúcares neutros constituyen las “zonas pilosas”, mientras que la parte no sustituida de la cadena de pectina se denomina “zona lisa”, compuesta por homogalacturanos. En este modelo no se considera la posición del ramnogalacturano II. Recientemente, un nuevo modelo de la estructura de pectina

se propuso, en donde el homogalacturonano (HG) se coloca como cadena lateral del ramnogalacturonano I (RGI), el HG puede estar unido a residuos de ramnosa o de ácido galacturónico del RGI (Figura 5).

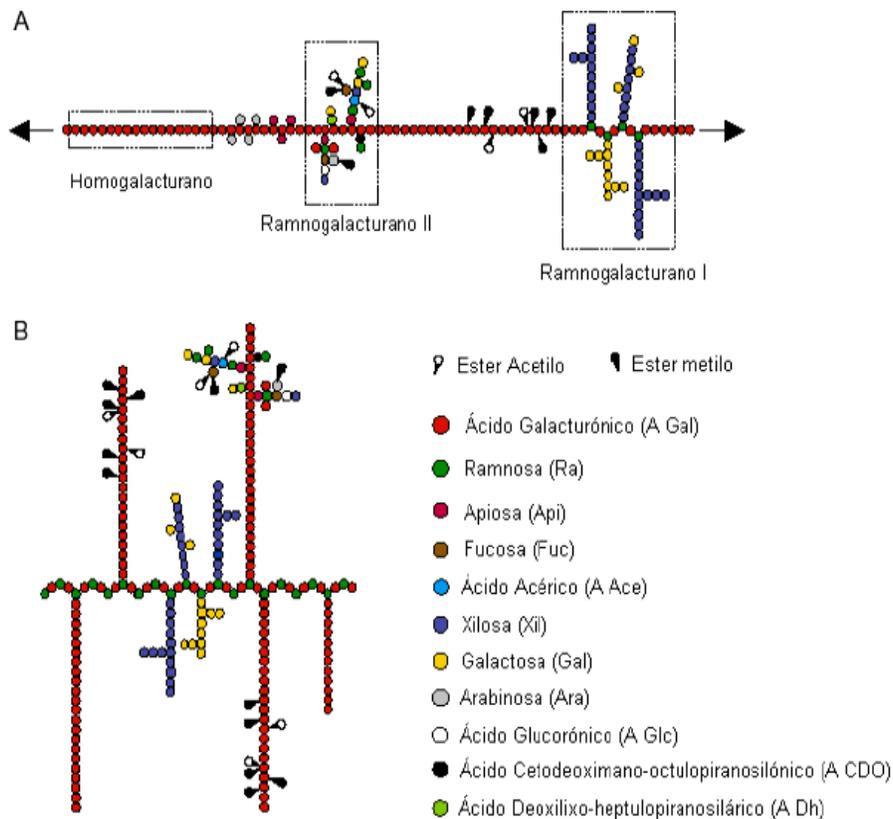


Figura 5. Representación de la estructura básica de la pectina (A) Propuesta convencional. (B) Estructura recientemente propuesta (adaptado de Willats et al., 2006).

2.5.2 Gelificación de pectinas

En las pectinas algunos de los grupos carboxilo del ácido galacturónico están esterificados con metanol y grupos acetilos, dando lugar a pectinas de bajo grado de metoxilación (<50% de los grupos carboxilo están metoxilados) y pectinas de alto grado de metoxilación (>50% de los grupos carboxilo están metoxilados) (Willats et al., 2006). Las propiedades funcionales de las pectinas dependen

fuertemente de su estructura molecular. Las pectinas de alto grado de metoxilación pueden gelificar en medio ácido ($\text{pH} < 3.5$) en presencia de cosolutos, típicamente sacarosa a concentraciones superiores a 55% p/p; estos geles se denominan geles ácidos. La concentración alta de azúcar disminuye la actividad acuosa lo cual da lugar a la formación de interacciones hidrofóbicas entre grupos metoxilo. En estos geles, el valor bajo de pH reduce la disociación de grupos carboxilo y por lo tanto disminuyen las repulsiones electrostáticas, favoreciendo enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo (Fraeye, Duvetter, Dounsla, Van Loey & Hendrickx, 2010). Por otra parte, para la gelificación de pectinas de bajo metoxilo es indispensable la presencia de iones calcio, los cuales actúan como entrecruzadores de cadenas a través de los grupos carboxilo libres (Figura 6).

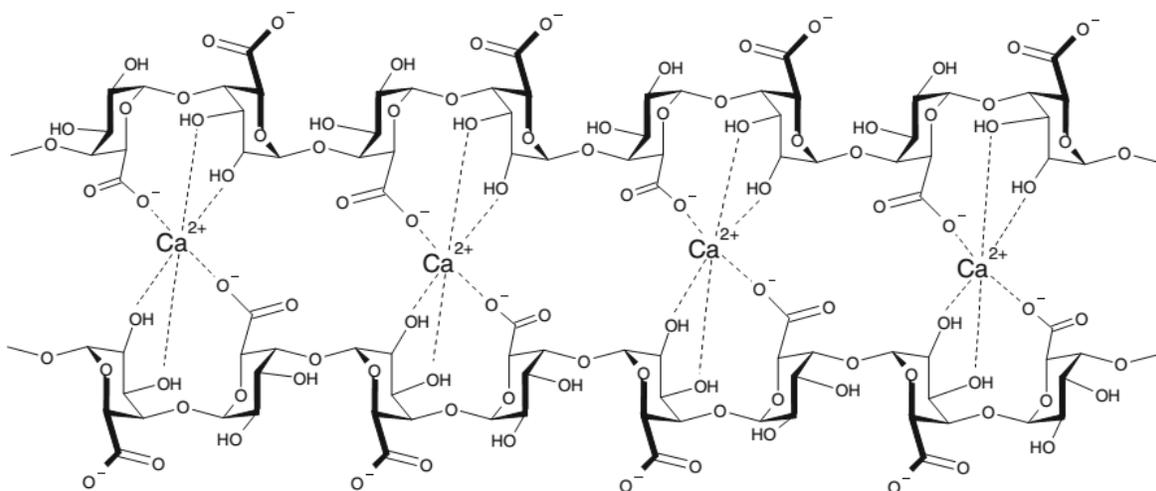


Figura 6. Esquematación de los entrecruzamientos de pectina de bajo metoxilo a través de iones calcio (adaptado de Voragen et al. (2009).

El mecanismo de gelificación de pectinas de bajo metoxilo se ha descrito a través del Modelo de la “Caja de Huevo”, inicialmente propuesto para alginato. En dicho modelo se asume que existen hélices de poligalacturonano, cooperativamente unidas a través de iones de calcio, los cuales se “empacan” en los intersticios de las cadenas de poligalacturonano (Fraeye et al., 2010). La gelificación de pectinas de bajo metoxilo establece una unión cooperativa de Ca^{+2} a residuos de ácido

galacturónico (AGal) no esterificados y contiguos (referidos como bloques), presentes en moléculas de pectinas adyacentes (Ngouémazong et al., 2012b). La extensión de esa cooperatividad depende del número de unidades de AGal contiguas involucradas en las zonas de unión. Hasta ahora, es controversial el número mínimo requerido de estas unidades, para generar zonas de unión estables. Se han determinado desde un mínimo de 6 y hasta 20 unidades de AGal no esterificadas (Fraeye et al., 2010). El tamaño y distribución de bloques de AGal en las moléculas de pectina tiene una contribución fuerte en la naturaleza (fuerza/estabilidad) y número de zonas de unión que se presentan en las redes pectina- Ca^{2+} . La presencia de grandes bloques de AGal distribuidos en la red de pectina contribuye positivamente en el carácter elástico de los geles de pectina de bajo metoxilo (Ngouémazong et al., 2012b). También se ha reportado que el número de grupos metoxilo y su patrón de distribución, así como el grado de ramificaciones que tiene la molécula (cadenas laterales de azúcares neutros) y el contenido de calcio presente, afectan fuertemente las propiedades reológicas de los geles de pectina de bajo metoxilo, dando lugar a sistemas con propiedades viscoelásticas características de “líquidos estructurados” hasta sistemas tipo “gel fuerte” (Ngouémazong et al., 2012b). La des-ramificación de moléculas de pectinas ha conducido a una disminución del carácter elástico de los geles de pectina-calcio, atribuible a una reducción en los entrecruzamientos físicos entre las cadenas laterales (ramificaciones de azúcares neutros), que estabilizan la red, posiblemente al reducir la movilidad de las cadenas de pectina, lo cual se presume, genere un incremento en el carácter elástico del gel de pectina (Ngouémazong et al., 2012a).

2.6 Pectinas de cáscara de tuna

Son pocos los estudios realizados sobre la extracción de pectinas de la cáscara de tuna, Forni et al., (1994) realizaron una extracción ácida con HCl (pH=2), 2 h y 80 °C, obteniendo 0.12% (p/p) de pectinas en base seca, con un contenido de ácido galacturónico de 64.3% y un grado de esterificación de 10%. Otro estudio es el de

Majdoub et al. (2001), donde se reportan rendimientos de 7% y 7.3% (p/p) base seca de pectinas usando dos tipos de extracción, la primera se realizó en un medio ácido-alcohólico (pH=2) por 48 h y la segunda en un medio acuoso por 2 h, ambas a 80 °C. Por otra parte, Habibi et al. (2004), reportaron rendimientos de 6.1 y 12.4% (base seca) de extracciones realizadas bajo condiciones acuosas y con ayuda de agentes quelantes (0.5% de EDTA) con tiempos de 2 h y 2 etapas a 60 °C. Estos tres trabajos se realizaron usando cáscara de tuna de la variedad *Opuntia ficus-indica*.

Para el caso de la estructura química de la pectina de tuna, estudios realizados por resonancia magnética nuclear (RMN) por Habibi et al. (2004), se reportan la estructura de 2 tipos de pectina extraídas de la cáscara de tuna (*Opuntia ficus-indica*), las primeras fueron aquellas que son solubles en agua a 60 °C y las segundas fueron extraídas con una solución de EDTA a la misma temperatura. En ambos casos se demostró que las pectinas poseen 2 regiones estructurales: un homogalaturano y una cadena ramificada conformada por una unidad repetitiva del disacárido L-ramnosa y D-galactosa (ramnogalacturano) unidos por enlaces α -(1→2) y α -(1→4), con cadenas cortas de galacturano y cadenas largas de arabinosa, unidas a unidades de ramnosa de la cadena principal (Figura 7).

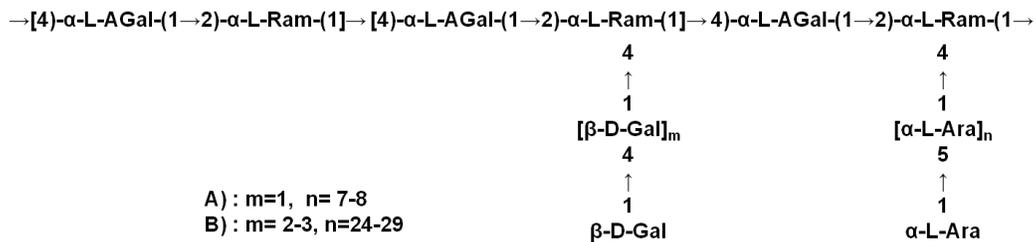


Figura 7. Estructura química de la cadena ramificada de pectina de tuna (*Opuntia ficus-indica*). A) Pectina extraída con agua a 60 °C y B) Pectina extraída con una solución de EDTA a 60 °C (Habibi et al., 2004).

En estudios previos (Lira-Ortiz, 2009; Lira-Ortiz et al., 2014) se demostró que se puede extraer un polisacárido tipo pectina de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* Scheinvar) variedad Alfajayucan, con rendimientos de extracción cercanos al 10% (base seca), utilizando un proceso de extracción con soluciones acuosas de agentes quelantes (EDTA, 1% p/p), 60-70 °C y 2 h de agitación continua. El polisacárido extraído presentó características químicas de pectina con un grado de metoxilación cercano al 30%. A través de cromatografía de líquidos, se determinó que la pectina de tuna es un polisacárido compuesto por 65.4% de ácido galacturónico y azúcares neutros en donde predominan: galactosa (19.50%), arabinosa (0.12%), ramnosa (2.16%) y glucosa (0.12%). Además se determinó que es un polisacárido complejo formado por fracciones de distintas masas moleculares: 1320 kDa (30.6%), 318 kDa (38%), 33.7 kDa (19.4%) y 4.2 kDa (12.1%).

Las propiedades reológicas de disoluciones acuosas (0.5, 1 y 2% p/p) de pectinas de tuna presentaron comportamiento reológico no newtoniano, el cual se ajustó al Modelo de Cross. Cabe mencionar que la viscosidad aparente de estas disoluciones fue superior a la que presentaron disoluciones de pectinas cítricas comerciales. Por otra parte, la adición de iones calcio a disoluciones acuosas de pectina de tuna generó geles suaves, cuyo carácter elástico, evaluado a través de pruebas de viscoelasticidad dinámica, se incrementó con la concentración de calcio añadido (0.25 a 0.75 mM CaCl_2). Los valores de $\tan \delta (=G''/G')$ de los distintos geles obtenidos, estuvieron en el intervalo de 0.06 a 0.12, lo cual denota un carácter de gel "verdadero". Por lo tanto, es posible sugerir a la cáscara de la tuna como una nueva fuente de hidrocoloides espesantes y gelificantes, que pudieran ser de amplio uso en la industria alimentaria y farmacéutica.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la tuna ha sido muy apreciada por sus cualidades alimenticias y sabor característico. Actualmente se cultiva en gran parte del país, pero el 90% de la producción nacional se registra en los estados de México, Zacatecas, Puebla e Hidalgo (SIAP, 2013). De acuerdo a los datos de SAGARPA, en 2012 se obtuvo una producción nacional de 527,627 toneladas de tuna, 34% mayor a lo producido en 2011 (SIAP, 2013). El cultivo de tuna representa una alternativa productiva para la región árida y semiárida de México, debido a la extensa gama de variedades de tuna que existen en el país, lo que representa una ventaja para liderar los mercados internacionales de este producto. Actualmente las organizaciones de productores de tuna trabajan en la producción de nuevas variedades de ésta para ampliar la oferta en los mercados internacionales, principalmente Estados Unidos de América y Europa (ASERCA, 2011).

El consumo de tuna en el país es principalmente como fruta fresca y en menor cantidad en la elaboración de melcocha, miel, jalea y bebidas fermentadas. Se ha estimado que más del 60% de la fruta se pierde en el campo (Lozada-Carbajal, 2007) debido a la saturación del mercado en los meses de producción, disminuyendo los precios del fruto y haciendo incosteable su cosecha. Aunado a esto, no se han desarrollado tecnologías de conservación y/o aprovechamiento del fruto a nivel industrial, por lo que es importante contar con tecnologías viables para el aprovechamiento integral y eficiente de este fruto mexicano.

En la actualidad, hay algunos reportes que demuestran el potencial aprovechamiento de la cáscara de tuna para la obtención de polisacáridos tipo pectina (Habibi et al., 2004; Habibi, Mahrouz & Vignon, 2005; Lira-Ortiz et al., 2014). Estos estudios también han confirmado que las pectinas o polisacáridos

pécticos de tuna tienen propiedades reológicas de interés para la industria de alimentos; son hidrocoloides viscosificantes y gelificantes, incluso con valores de viscosidad aparente, pseudoplasticidad y módulos viscoelásticos superiores a los presentados por pectinas comerciales en solución (Lira-Ortiz et al., 2014). Para el presente estudio se propone la utilización de una tecnología emergente, “ultrasonido”, para facilitar la extracción de pectinas de la cáscara de tuna. Entre las ventajas que se esperan obtener al utilizar esta tecnología se encuentran, el aumentar la productividad del proceso de extracción (disminuir los tiempos de proceso con el posible incremento en el rendimiento) y obtener una tecnología más amigable con el medio ambiente. Se considera importante impulsar el aprovechamiento sustentable de productos naturales de México, muchos de éstos sub-aprovechados y poco valorados, pudiendo ser un atractivo comercial en el mercado internacional. Adicional a esta situación, los precios de las pectinas están en continuo ascenso y las grandes empresas de hidrocoloides alimentarios están incorporando pectinas a su lista de productos, debido a su inocuidad y a los efectos positivos de su consumo en la salud humana (Kelco, 2014). No obstante que la industria de las pectinas se ha basado principalmente en los cítricos, nuevas fuentes de éstas con propiedades de interés para la industria de alimentos pueden ser atractivas desde el punto de vista económico, tal es el caso de la tuna, considerando que las pectinas de ésta se encuentran mayoritariamente en la cáscara, la cual no es comestible y no se aprovecha industrialmente.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Diseñar un proceso de extracción asistida con ultrasonido para obtener pectinas de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.), el cual genere productividades mayores que el proceso de extracción convencional (extracción acuosa con agentes quelantes), sin detrimento en las propiedades funcionales del polisacárido.

4.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de las variables del proceso de ultrasonido (tiempo, intensidad ultrasónica y temperatura), sobre el rendimiento total, productividad final de extracción y propiedades macromoleculares (i.e. peso molecular promedio y composición química) de pectinas de tuna extraídas con la asistencia de ultrasonido de alta intensidad, con la finalidad de establecer un proceso de extracción con productividad mayor a la extracción convencional, sin detrimento en las propiedades macromoleculares de la pectina extraída.
2. Evaluar las propiedades reológicas de pectinas de tuna extraídas con asistencia de ultrasonido de alta intensidad, a través de pruebas de cizalla simple estacionaria y de viscoelasticidad lineal para determinar el efecto de las condiciones de extracción sobre la funcionalidad de pectinas de tuna.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México existe un gran potencial para el desarrollo de plantaciones de nopal tunero, debido principalmente a la riqueza genética del nopal que permite ofrecer gran variedad de tonalidades, sabores, formas y tamaños de los frutos; contrario a la mayor parte de los países donde se produce comercialmente, en donde la producción depende de uno o dos cultivos. Sin embargo, las plantaciones se encuentran actualmente deterioradas, lo cual se refleja en precios bajos al productor y una baja rentabilidad. Entre los problemas generales que inhiben el adecuado desarrollo de la cadena productiva nopal-tuna, sobresalen la baja calidad del producto, la existencia de un solo periodo de producción al año, baja transformación industrial, bajo desarrollo de los canales de comercialización (excesivo intermediarismo), deficiente organización de los productores, mercado interno limitado, escasa a nula transferencia tecnológica, falta de apoyo crediticio y no se ha desarrollado el mercado externo (ASERCA, 2011).

Ante esta problemática es necesario definir estrategias que permitan incrementar el rendimiento y calidad del producto, capacitar a los productores en la aplicación de innovaciones tecnológicas, así como brindarles asistencia técnica. Una vertiente importante a desarrollarse es la obtención de productos con mayor valor agregado a partir de la tuna. Entre éstos se puede citar la extracción de polisacáridos estructurales de la cáscara (pectinas, mucílagos, hemicelulosa, celulosa), los cuales pueden tener propiedades de interés para la industria farmacéutica y de alimentos. En particular, la extracción de pectinas o polisacáridos pécticos resulta de interés por las propiedades reológicas que imparten estos hidrocoloides a los medios en donde son incluidos. Actualmente, las pectinas son polisacáridos que se usan para incrementar la viscosidad de alimentos, para estabilizar suspensiones, como agentes gelificantes y como materiales para elaborar películas comestibles para empacar alimentos. No

obstante que la industria de las pectinas se ha centrado en los cítricos, es posible extraer pectinas de fuentes no convencionales, lo cual puede ser atractivo desde el punto de vista económico y científico. Algunos estudios revelan el potencial uso de cáscara de tuna blanca como fuente de pectinas de bajo metoxilo (Lira-Ortiz et al., 2014), las cuales pueden ser de interés como aditivos para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Adicionalmente, en los últimos años diversos estudios han revelado las propiedades nutricionales de la tuna, coincidiendo en reportar que este fruto es una fuente importante de fibra, pigmentos, minerales, antioxidantes y vitamina C (Piga, 2004).

Sin duda, la posibilidad de la utilización integral de la tuna es de especial atractivo e interés para el sector industrial, ya que toda la industria busca obtener el máximo potencial de sus materias primas. Por otra parte, el desarrollo de tecnologías eficientes y amigables con el ambiente, las cuales aprovechen las propiedades funcionales de la tuna y sus subproductos, beneficiaría el cultivo de nopal tunero y dicho cultivo podría convertirse en un excelente soporte económico para el país. Adicionalmente, si se fortalece la economía en torno a la explotación sustentable de la tuna, se contribuirá a la conservación de suelos y restablecimiento de nichos ecológicos propios de estos cultivos.

6. HIPÓTESIS

Es posible incrementar la productividad final ($g_{\text{pectina extraída}} L^{-1} h^{-1}$) de la extracción de pectina de cáscara de tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.), a través del uso de ondas ultrasónicas de alta intensidad, sin detrimento en las propiedades macromoleculares (peso molecular, grado de metoxilación, contenido de ácido galacturónico y composición de azúcares neutros) y reológicas de la pectina extraída.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tuna

Se procedió a la recolección de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de la variedad Alfajayucan cultivada en la región de San Martín de las Pirámides, Estado de México (coordenadas 19.66 - 98.72) (Figura 8). De acuerdo al criterio de selección propuesto por Lira-Ortiz et al. (2014), se usaron cáscaras de tuna de aquellos frutos que se encuentren en un estado de maduración óptimo para su comercialización y consumo (i.e. cáscara verde medio o verde claro, sin daño físico y color uniforme, Figura 9). Posteriormente, la cáscara de tuna se escaldó por 30 min con vapor saturado ($P= 96 \text{ kPa}$), se envasó en bolsas de polietileno y se conservó en congelación a una temperatura de $-16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior experimentación.



Figura 8. Región geográfica donde fueron recolectadas las tunas (*Opuntia albicarpa*, Scheinvar) usadas en este estudio.



Figura 9. Tuna blanca (*Opuntia albicarpa* S.) variedad Alfajayucan, usadas en este trabajo.

De acuerdo con Gallegos Vázquez, Cervantes Herrera & Barrientos Priego (2005), se hizo un muestreo de la tuna de forma aleatoria usando 60 unidades experimentales, en las cuales se determinaron los siguientes parámetros: diámetro máximo, longitud, forma, color, peso del fruto, espesor de la cáscara, peso de cáscara y pulpa (Cuadro 4.). Estas determinaciones se realizaron para confirmar la variedad de tuna usada en este trabajo.

Cuadro 4: Parámetros cualitativos determinados a la tuna usada en este trabajo.

Parámetro	Valor
Forma	Elíptica
Color	Verde medio

Cuadro 5: Parámetros cuantitativos determinados en tunas usadas en este trabajo.

Parámetro	Promedio	Desviación estándar
Longitud (mm)	78.91	6.41
Diámetro máximo (mm)	52.71	2.91
Relación longitud/diámetro máximo	1.50	0.11
Espesor cáscara (mm)	4.47	1.03
Peso fruto (g)	112.62	15.91
Peso pulpa (g)	67.59	10.91
Peso cáscara (g)	44.21	8.31
Relación cáscara/pulpa	0.66	0.14

7.2 Métodos

7.2.1 Extracción de pectina de cáscara de tuna

Se reprodujo el proceso de extracción en 2 etapas desarrollado por Lozada-Carbajal (2007) y Lira-Ortiz (2009) con algunas modificaciones. Se utilizó un tanque enchaquetado de vidrio (5 L) acoplado a un agitador Lightnin con control de torca (LabMaster Mixer, modelo L1U10F), velocidad de agitación y temperatura, y a un baño recirculador con control de temperatura (Figura 10). El volumen de operación fue de 3 L, con una relación cáscara escaldada/medio acuoso de 26 g/100 mL, usando agua destilada como disolvente. El procedimiento consistió en:

Etapa 1: Eliminación de polisacáridos solubles (mucilagos) a 60 °C con agitación de 550 rpm durante 1 h. Una vez concluido este tiempo, se procedió a realizar un filtrado con lienzo de organza. La fase líquida (extracto) fue desechada y la fase sólida fue re-suspendida en agua. Este proceso se realizó 2 veces.

Etapa 2: Obtención de pectinas. En esta etapa las cáscaras (fase sólida de la etapa 2) fueron divididas en 4 partes y cada parte fue re-suspendida en 750 mL de una solución ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) al 0.5% (p/v), para posteriormente ser sometidas al tratamiento ultrasónico (Cuadro 6) (Figura 10).

Finalizado este procedimiento, el residuo sólido se separó por filtración usando un lienzo de organza. El material sólido agotado se desechó, el sobrenadante se enfrió y se mezcló con etanol frío (-20 °C) al 96% v/v en una relación 1:1.5 solución-etanol para precipitar las pectinas extraídas.



Figura 10. Montaje experimental para la extracción convencional de pectinas de cáscara de tuna.

Para las extracciones asistidas con ultrasonido, se usó un procesador ultrasónico Sonics & Materials (VCX-1500) de 1500 W con una sonda de 20 kHz para materiales líquidos y semilíquidos (Figura 11).

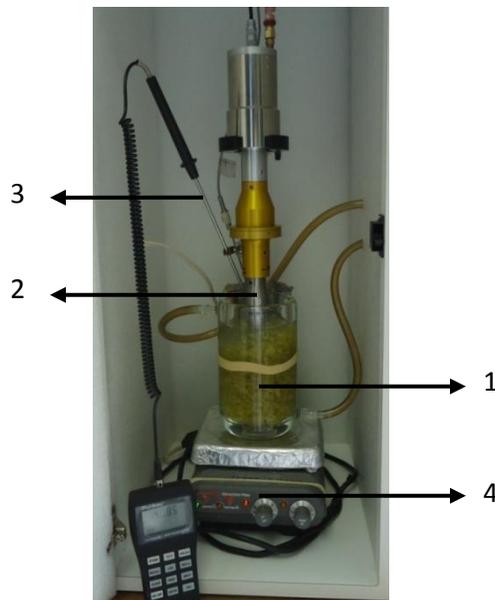


Figura 11. Montaje experimental del proceso de extracción asistida con ultrasonido. Se muestra la cabina con el recipiente enchaquetado¹ (1 L) en donde se efectúa la extracción, la sonda de ultrasonido², termopar³ para monitoreo de la temperatura y parilla con agitación magnética⁴ para mantener en suspensión las cáscaras de tuna durante la extracción.

La matriz experimental del presente trabajo de investigación se muestra en el Cuadro 6. El tratamiento denominado “Blanco” o “Extracción convencional” consistió en colocar la suspensión de cáscaras de tuna en el equipo de ultrasonido pero con la sonda apagada.

Cuadro 6: Matriz experimental del presente trabajo de investigación.

Tratamiento	Amplitud del ultrasonido (%)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Blanco 1	-----	120	40
Blanco 2	-----	120	60
1	30	5	40
2	30	10	40
3	30	15	40
4	30	30	40
5	30	5	60
6	30	10	60
7	30	15	60
8	30	30	60
9	90	5	60
10	90	10	60
11	90	15	60
12	90	30	60

7.2.2 Determinación del rendimiento total y productividad final del proceso de extracción

El rendimiento total (R) de extracción en los diferentes tratamientos se determinó a partir de la siguiente ecuación:

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

Para este cálculo se determinó previamente el contenido de sólidos secos totales de la cáscara de tuna, el cual se realizó por desecación hasta peso constante en una estufa de secado (Lab-Line, Mod: 3618) a presión reducida (30 kPa).

La productividad fina de cada uno de los tratamientos se calculó con la Ecuación 2:

$$P = \frac{SP}{Vt} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

SP: sólidos secos precipitados con etanol en cada sobrenadante de la extracción (g).

V: Volumen de operación (L)

t: tiempo de extracción (h)

7.2.3 Purificación de la pectina extraída

El polisacárido obtenido por los diferentes tratamientos de extracción fue re-suspendido en agua desionizada a temperatura ambiente, usando una parrilla con agitación magnética. Una vez disperso el polisacárido, se centrifugó por 20 min a 4500 rpm (≈ 2000 g) y 5 °C. Este proceso tuvo la finalidad de separar los sólidos no solubles en agua. El sobrenadante se sometió a un proceso de diálisis usando membranas de 12 kDa de corte molecular. La diálisis se realizó contra agua desionizada a temperatura ambiente y agitación constante. El recambio de agua se hizo como mínimo cada 8 h durante 24 h. Concluida la diálisis, la suspensión acuosa del polímero se recuperó con etanol frío. Por último, el polisacárido fue secado a 50 °C durante 24 h en una estufa de secado convectivo (Shell Lab, 1380SX), molido y tamizado (malla 100).

7.2.4 Determinación de proteína

Se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1995). Se realizaron determinaciones en la pectina clarificada y en los residuos obtenidos del proceso de purificación (parte insoluble). En cada caso se usaron 0.1 g de muestra. El porcentaje de nitrógeno total se calculó usando la Ecuación 3 y se usó un factor de 6.25 para convertir nitrógeno total a contenido de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$N = \frac{(V-V_0)(N_{HCl})(meqN)}{M_m} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

N= nitrógeno total ($\text{g}_{\text{nitrógeno}}/\text{g}_{\text{muestra}}$)

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

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

N_{HCl}= normalidad de HCl (miliequivalentes/mL)

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

M_m= masa de la muestra (g)

7.3 Parámetros macromoleculares de las pectinas extraídas

7.3.1 Identificación de grupos funcionales por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El objetivo de este análisis fue confirmar la naturaleza péctica de los polímeros extraídos, identificando los grupos funcionales típicos en pectinas. Los espectros FTIR permitieron hacer una comparación con una pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436) con un grado de esterificación de 55-70%, con la finalidad de que sirviera como referencia y poder identificar los grupos funcionales característicos de polisacáridos tipo pectina. Para este estudio, se utilizó un espectrómetro de FT-IR (Perkin Elmer, *Spectrum Two*) y un software para el análisis de datos *Spectrum* Perkin Elmer. Se realizaron los barridos en la región del infrarrojo de 4000 a 650 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 8 acumulaciones. Estos estudios se realizaron bajo la asesoría del Dr. Edgar García Hernández, en el Instituto Tecnológico de Zacatepec, Morelos.

a) Determinación de ácidos urónicos

Se realizó una hidrólisis usando 50 mg de pectina en 2.5 mL de H_2SO_4 2 M, con agitación lenta por 3 h y 100 °C. Una vez terminado este proceso, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se adicionaron 3.5 mL de NaOH 2 M, la solución se aforó en un matraz de 50 mL y se filtró con papel Whatman No. 1. La cuantificación del contenido de ácidos urónicos se realizó a través del Kit K-Uronic (Megazyme), el cual es específico para la cuantificación de ácidos D-urónicos de hexosas, incluyendo D-glucurónico y D-galacturónico, principales componentes de los polisacáridos de la pared celular de plantas.

El principio del método es la oxidación de los ácidos D-glucurónico o D-galacturónico a D-glucarato o D-galactato, respectivamente, por la enzima uronato deshidrogenasa en presencia del dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD^+). Durante esta reacción se forma NADH, la cantidad de éste está estequiométricamente relacionada con la cantidad de ácidos urónicos presentes en la muestra. La cantidad de NADH se mide a través de la absorbancia de la muestra a 340 nm. Se realizó una curva estándar con ácido galacturónico.

b) Determinación de pesos moleculares

La distribución de pesos moleculares de las pectinas de tuna se realizó por cromatografía de líquidos de tamiz molecular (HPLC-GPC) en un cromatógrafo Perkin Elmer Series 200 equipado con detector de índice de refracción, usando una columna TSK gel 5000PWXL 7.8 mm, DI x 30 cm, 10 μ . La fase móvil usada fue H_2O a 65 °C con flujo de 0.6 mL/min. Las disoluciones de pectina fueron filtradas a través de membranas de 0.2 μm previo a su inyección en el cromatógrafo.

Para la determinación de los pesos moleculares de las fracciones de pectina presentes en cada muestra en cada tratamiento, se usó una curva de calibración elaborada con los tiempos de elución de estándares de polisacáridos (Poly Science) de 22.8 a 1000 kDa. El porcentaje de cada fracción en la pectina se determinó a través de la contribución porcentual del área de pico de cada fracción en el total de la muestra. El peso molecular promedio (\bar{M}_w) se calculó con la Ecuación 4. Los análisis se realizaron por la Dra. Elvira Ríos Leal, en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Zacatenco.

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i m_i M_i}{\sum_i m_i} \quad (\text{Ec. 4})$$

Dónde:

\bar{M}_w = Peso molecular promedio

m_i = Fracción másica de la especie i

M_i = Peso molecular de la especie i

c) Determinación del grado de metoxilación y acetilación

El grado de metoxilación y acetilación de las distintas pectinas obtenidas, se determinó simultáneamente a través de cromatografía de líquidos acoplada a un detector de índice de refracción (Varian 9002 HPLC). Se adaptó el método propuesto por Voragen et al. (1986), usando metanol y ácido acético como estándares. Para determinar el grado de metoxilación y acetilación de las pectinas extraídas se usaron las Ecuaciones 5 y 6. Los análisis se realizaron por la Dra. Elvira Ríos Leal, en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Zacatenco.

$$\text{grupos metoxilo (\% mol)} = \frac{\text{moles de metanol}}{\text{moles de ácido galacturónico}} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\text{grupos acetilo (\% mol)} = \frac{\text{moles de ácido acético}}{\text{moles de ácido galacturónico}} \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

d) Cuantificación de azúcares neutros

Para la determinación de azúcares neutros en los polisacáridos obtenidos se realizó un lavado de las muestras con isopropanol con el fin de eliminar impurezas. Una vez seco el material, se realizó una hidrólisis con HCl 6 N por 4 h a 100 °C. El HCl se eliminó por evaporación y se determinó la composición de azúcares neutros por cromatografía de líquidos (Varian 9002 HPLC) acoplada a un detector de índice de refracción, con una columna Sugar SC 1011 (300 × 8 mm), usando un flujo de agua de 0.3 mL/min a 60 °C. Los análisis se realizaron por la Dra. Elvira Ríos Leal, en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Zacatenco.

7.3.2 Caracterización reológica

a) Pruebas de cizalla estacionaria

Se realizaron pruebas de cizalla estacionaria en disoluciones acuosas al 2% p/p de las muestras clarificadas de pectina extraídas en cada tratamiento. Se usó un reómetro de esfuerzo controlado (AR2000, TA Instruments) y la geometría de cono-plato (acrílico, diámetro: 60 mm, 2°). Las muestras se cizallaron en el intervalo de 0.01 a 100 s⁻¹, con un tiempo de estabilidad del flujo en el equipo de 30 s en cada valor de velocidad de deformación. Todas las determinaciones se realizaron a 25 °C por triplicado. Las curvas de flujo se ajustaron al modelo reológico más conveniente, Ostwald-de Waele (Ec. 7) o Cross (Ec. 8) (Rao, 2007).

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

σ = Esfuerzo de cizalla (Pa)

$\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla (s^{-1})

K = Índice de consistencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)

n = Índice de flujo (adimensional)

$$\eta = \frac{\eta_0}{[1+(\lambda\dot{\gamma})]^m} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

η = Viscosidad no newtoniana ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)

$\dot{\gamma}$ = velocidad de cizalla (s^{-1})

η_0 = Viscosidad newtoniana a baja cizalla ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)

λ = Constante de tiempo del modelo de Cross (s)

m = Exponente adimensional del modelo de Cross

b) Pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud

Se determinaron las propiedades viscoelásticas de disoluciones acuosas al 1% p/p de pectina en presencia de calcio (3 mM) para evaluar la capacidad gelificante y las propiedades viscoelásticas de los geles de las pectinas obtenidas en los distintos tratamientos. Las pectinas se dispersaron en NaCl 0.1 M, se calentaron hasta el punto ebullición ($\approx 92\text{ }^\circ\text{C}$) y se adicionó CaCl_2 para obtener la concentración de 3 mM de calcio en la solución final. El objetivo de usar una pantalla con NaCl es disminuir la carga neta del polímero, disminuir la repulsión entre moléculas de pectina y favorecer la gelificación vía puentes de calcio (Gigli,

Garnier & Piazza, 2009). Una vez obtenida la solución se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud en un reómetro de esfuerzo controlado (TA Instruments, modelo AR 2000). La caracterización reológica de los geles o soluciones de pectina consistió en:

- 1) Barrido de temperatura de los módulos dinámicos (G' , G'') de 70 °C a 25 °C (0.52 °C/min), a 1 Hz de frecuencia, con el objetivo de promover la gelificación.
- 2) Una vez 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 °C y 1 Hz de frecuencia. El objetivo de esta prueba es asegurar el estado estacionario previo a la determinación del espectro mecánico dinámico del posible gel formado. El estado estacionario de G' y G'' se determinó cuando la variación de estos módulos dinámicos fuera menor a 0.1 Pa/min.
- 3) Una vez alcanzado el estado estacionario o pseudo-estacionario, se realizó el barrido de frecuencia de 10^{-2} a 10^2 rad/s a 25 °C.
- 4) Finalmente se realizó un barrido de esfuerzos de 0.03 Pa a 100 Pa para verificar si las determinaciones anteriores se realizaron dentro de la zona de viscoelasticidad lineal (ZVL).

7.4 Análisis estadístico

Los datos de rendimiento y productividad de extracción con sus correspondientes réplicas, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Rendimiento y productividad de las extracciones

En el Cuadro 7 se presentan los resultados de humedad y cenizas de la cáscara de tuna fresca usada en esta investigación. Estos datos son requeridos para el cálculo del rendimiento y productividad de los procesos de extracción realizados en este trabajo.

Cuadro 7. Humedad y cenizas de la cáscara fresca de tuna (*O. albicarpa* S.).

Parámetro	Promedio	Desv. Std.
Humedad (%)	9.54	0.62
Cenizas (base húmeda) (%)	1.99	0.27
Cenizas (base seca) (%)	21.49	2.30

(n=5)

En el Cuadro 8, se muestra el promedio de los resultados de rendimiento total y productividad final de las extracciones asistidas con ultrasonido y de los tratamientos denominados como blancos, estos últimos correspondientes a extracciones convencionales (2 h) sin ultrasonido. Los resultados obtenidos muestran que tanto a 40 °C como a 60 °C se generaron incrementos en los rendimientos de extracción de pectina a medida que se incrementó el tiempo de extracción.

El análisis de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) muestra que los rendimientos obtenidos usando 30% de amplitud ultrasónica y 40 °C, no presentaron diferencias significativas en todos los tiempos de extracción evaluados. Los rendimientos de extracción de estos tratamientos tampoco fueron diferentes al rendimiento de la extracción convencional a la misma temperatura.

Por otra parte, los resultados de productividad a 40 °C fueron inferiores a los registrados a 60 °C (Figura 12), lo cual confirma que la temperatura tiene un papel importante en el proceso de extracción.

Cuadro 8. Rendimiento total y productividad final de la extracción de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.).

Tratamiento	Ultrasonido	Amplitud Ultrasonónica (%)	t (min)	T (°C)	Rendimiento total* (g _p /kg _{sc})	Productividad final (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Blanco 1	No	0	120	40	33.19 ^a ± 2.61	0.68 ⁱ ± 5.89×10 ⁻²
1	Si	30	5	40	NR	NR
2	Si	30	10	40	28.56 ^a ±7.28	7.06 ^{efg} ± 3.28
3	Si	30	15	40	30.96 ^a ± 8.09	4.96 ^{gh} ± 0.73
4	Si	30	30	40	37.43 ^{ab} ± 8.51	3.11 ^h ± 0.71
Blanco 2	No	0	120	60	51.27 ^c ± 2.43	0.73 ⁱ ± 0.035
5	Si	30	5	60	41.33 ^{ab} ± 4.89	14.07 ^a ± 1.61
6	Si	30	10	60	47.40 ^{bc} ± 4.99	8.04 ^{bc} ± 0.82
7	Si	30	15	60	51.72 ^{bc} ± 7.51	5.81 ^{de} ± 0.68
8	Si	30	30	60	70.12 ^e ± 7.66	3.96 ^{fg} ± 0.43
9	Si	90	5	60	39.69 ^{ab} ± 5.92	14.27 ^a ± 1.83
10	Si	90	10	60	54.83 ^{cd} ± 5.78	9.28 ^b ± 1.31
11	Si	90	15	60	64.45 ^{de} ± 7.71	7.08 ^{cd} ± 0.30
12	Si	90	30	60	90.53 ^f ± 9.79	4.97 ^{ef} ± 0.64

*Expresado como el cociente de la masa en gramos del polisacárido precipitado con etanol (g_p) y la masa en kilogramos de los sólidos secos de la cáscara de tuna (kg_{sc}).

NR= No reportado.

Medias con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas (comparación de medias de Tukey (α<0.05)).

En general, el aumento de la temperatura en el proceso de extracción mejora la transferencia de masa. Sin embargo, se ha reportado que un aumento en la temperatura produce menos cavitación debido a la disminución de la tensión superficial y al aumento de la presión de vapor (Esclapez et al., 2011; Kuijpers et al., 2002). En este proceso de extracción, el disolvente fue agua, por lo que se considera que las temperaturas de extracción usadas (i.e. 60 y 40 °C) no son lo suficientemente altas para generar presiones de vapor que disminuyan el efecto de cavitación. El incremento observado en el rendimiento de extracción al aumentar la temperatura, puede estar relacionado con el aumento en la difusión del disolvente en el material vegetal, favoreciendo la lixiviación de los componentes de la pared celular vegetal, los cuales parecieran estar disponibles por la degradación generada por el ultrasonido. Debido a los valores bajos, tanto en rendimiento y productividad, en las extracciones realizadas a 40 °C, se decidió no continuar evaluando esta temperatura con 90% de amplitud ultrasónica. Por lo tanto, el resto de los estudios se enfocaron en extracciones a 60 °C.

Por otra parte, los resultados obtenidos a 60 °C (30 y 90% amplitud ultrasónica) demostraron que tanto el tiempo como la intensidad ultrasónica influyen directamente sobre el rendimiento de extracción de pectina de tuna, es decir; existe un incremento del rendimiento a medida que aumentan ambas variables de proceso. Los resultados de análisis de comparación de medias mostraron que en los tratamientos con 30% de amplitud ultrasónica y 60 °C, no existe un incremento considerable del rendimiento de extracción durante los primeros 15 min de proceso, además las extracciones con 10 y 15 min de ultrasonido, presentaron rendimientos similares a la extracción convencional a la misma temperatura (Blanco 2) (Figura 12). Los estudios realizados a 90% de amplitud ultrasónica mostraron incrementos mayores en función del tiempo que los registrados con 30% de amplitud a la misma temperatura, lo que sugiere una relación directa del rendimiento de extracción y la intensidad ultrasónica usada.

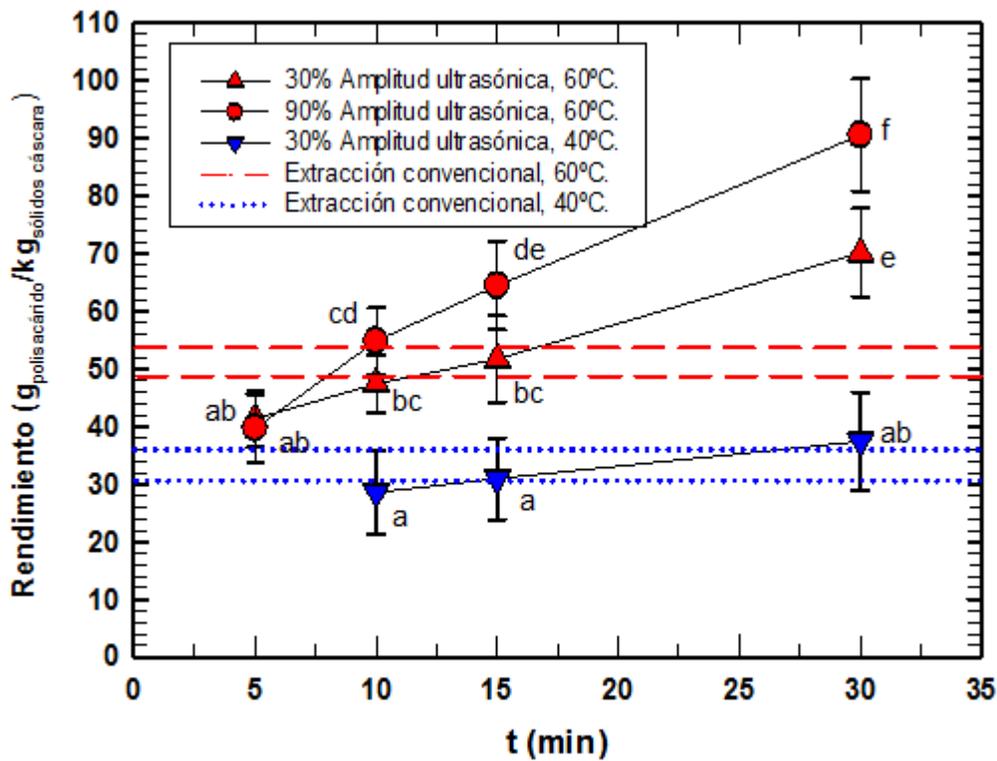


Figura 12. Rendimiento de extracción de pectinas de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.), en los distintos tratamientos examinados. Las líneas discontinuas indican el intervalo de valores que se obtienen en los procesos de extracción convencional (2 h, sin ultrasonido).

De forma similar a los tratamientos con 30% de amplitud ultrasónica, no se presentaron diferencias significativas en las condiciones de 10 y 15 min de extracción con 90% de amplitud y 60 °C, siendo la extracción de 10 min, el tratamiento que no presentó diferencia significativa con la extracción convencional. Adicionalmente, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 8 y 11, es decir se obtiene el mismo rendimiento usando 90% de amplitud ultrasónica durante 15 min que realizando las extracciones con 30% de amplitud ultrasónica pero durante 30 min (ver Cuadro 8). Finalmente, el valor de rendimiento más alto alcanzado en este trabajo fue la condición de 30 min, 90% de amplitud ultrasónica y 60 °C (i.e. 90.53 g_{polisacárido}/kg_{sólidos cáscara}), que mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos estudiados.

Estos resultados concuerdan con estudios realizados por diferentes autores, Lira-Ortiz (2009) reportó que el rendimiento de extracción de pectinas de cáscara de tuna fue de 98 ± 0.56 g polisacárido/kg sólidos cáscara de la misma variedad tuna a 70 °C con una solución de EDTA al 1%. La diferencia entre ese estudio y los resultados del presente trabajo pudiera deberse principalmente a la utilización de una temperatura más elevada y de una concentración mayor de EDTA, que le permitieron una mejor lixiviación de los polímeros a extraer, por otra parte, aunque en este trabajo se operaron condiciones inferiores de temperatura y concentración de agente quelante, se pueden obtener rendimientos cercanos con la acción del ultrasonido, usando las condiciones de 90% de intensidad ultrasónica, durante 30 min a 60°C y con 0.5% de EDTA, que ilustra la acción del ultrasonido de alta intensidad en la extracción de estos polímeros pécticos.

En otros estudios (Majdoub et al., 2001), se reportaron rendimientos de 70 y 73 g polisacárido/kg sólidos cáscara de pectina usando dos tipos de extracción, la primera en un medio ácido-alcohólico y la segunda en un medio acuoso, estas extracciones fueron realizadas con cáscara de tuna *Opuntia ficus-indica*. Los resultados citados son similares a los obtenidos en la extracción convencional en este trabajo. En extracciones ácidas (pH=2) de pectina de tuna (*Opuntia ficus-indica*), los resultados de rendimiento han sido bajos (i.e 1.2 g polisacárido/kg cáscara húmeda), con tiempos de proceso de 2 h y temperatura de 80 °C (Forni et al., 1994). Con la misma especie de tuna, Habibi et al. (2004) reportaron rendimientos de extracción de pectina de 124 g polisacárido/kg sólidos cáscara. En ese trabajo, las condiciones de extracción fueron similares a la “extracción convencional” del presente estudio, salvo que Habibi et al., usaron una remoción adicional de mucílagos de 2 h, previa a la extracción de pectinas.

En la Figura 13, se presentan los valores obtenidos de productividad del presente trabajo, donde se puede apreciar que los valores máximos se obtuvieron en los tratamientos a 60 °C con 5 min de ultrasonificación. Debido al tiempo de proceso, la extracción convencional presentó valores de productividad inferiores, en más de un orden de magnitud, a las extracciones con ultrasonido (ver Cuadro 8). Comparando las productividades de los tratamientos que generaron valores de rendimiento de extracción iguales a la extracción convencional a 60 °C (i.e. 10 y 15 min a 30% de amplitud ultrasónica, 10 min a 90% de amplitud ultrasónica; todos a 60 °C), se observó que la extracción con ultrasonido de alta intensidad generó productividades de 8 hasta 13 veces mayores a la productividad del proceso de extracción convencional. En otros trabajos (ver Cuadro 3) también se ha observado que los rendimientos de extracción de pectina de tuna no se incrementan sustancialmente con el uso de ultrasonido, pero los tiempos de proceso se reducen generando mayores productividades y por lo tanto el gasto energético podría disminuirse, considerando también que la extracción con ultrasonido frecuentemente se realiza a menor temperatura (Bagherian et al., 2011; Košťálová et al., 2010; Panchev et al., 1994; Xu et al., 2014).

En trabajos recientes se ha concluido que existe un efecto sinérgico entre la temperatura y las ondas ultrasónicas en la extracción de pectinas. Los estudios cinéticos y de visualización del tejido vegetal sometido a ultrasonido, indican que la radiación ultrasónica genera mayor porosidad en el tejido vegetal, lo cual facilita la penetración del disolvente “caliente” en el tejido vegetal (lo cual se verificó con pruebas de hinchamiento del tejido), la hidrólisis de protopectina y la transferencia de masa de pectina desde el tejido degradado de la pared celular vegetal hasta el medio de extracción (Xu et al., 2014). De forma similar al presente trabajo, Xu et al. (2014) reportaron rendimientos máximos similares de extracción de pectinas, entre el tratamiento convencional a 80°C (23.44% en 72 min) y aquel con ultrasonido (26.74% en 52 min) pero con disminución en el tiempo de proceso.

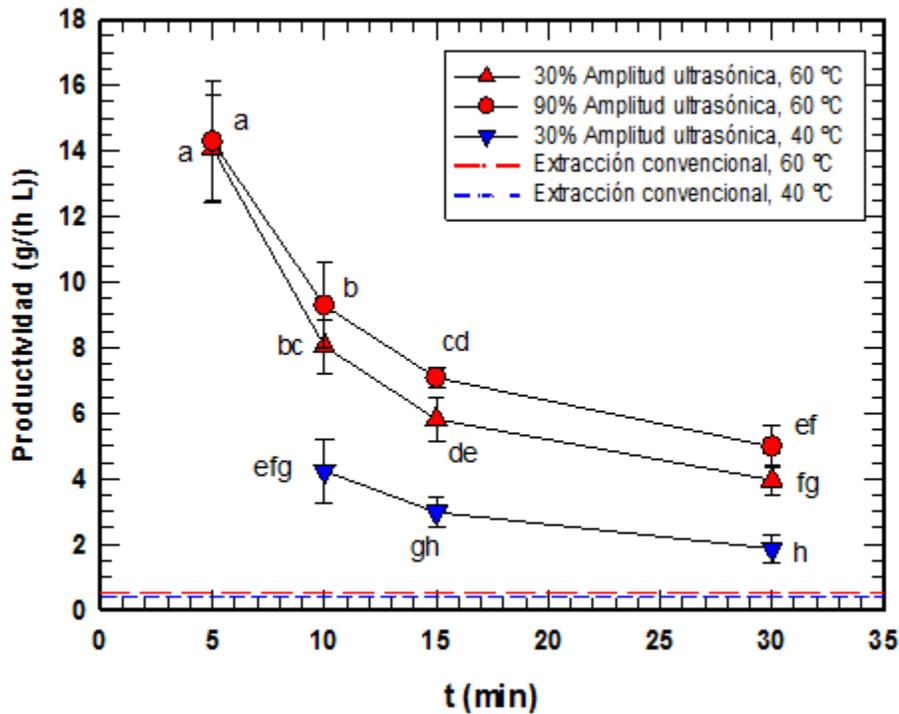


Figura 13. Productividad del proceso de extracción de pectinas de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) en los distintos tratamientos examinados. Las líneas discontinuas indican el intervalo de valores que se obtienen en los procesos de extracción convencional (2 h, sin ultrasonido).

8.2 Parámetros macromoleculares de las pectinas extraídas.

8.2.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

El objetivo principal de este análisis fue confirmar la naturaleza péctica de los extractos, identificando los grupos funcionales típicos de las pectinas y la huella dactilar. Para este estudio, se utilizó una pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436) con un grado de esterificación de 55-70%, con la finalidad de que sirviera como referencia para comparar los espectros FTIR de los extractos crudos extraídos y poder identificar los grupos funcionales característicos de polisacáridos tipo pectina. En una segunda etapa de este trabajo, los extractos se purificaron y se sometieron a espectroscopia de infrarrojo nuevamente.

Primera etapa: análisis de polisacáridos crudos

En las Figuras 14 y 15 se muestran los espectros completos FTIR ($4000-650\text{ cm}^{-1}$) de las pectinas de tuna extraídas y la pectina cítrica usada como referencia. En la región de 2600 a 4000 cm^{-1} se observa un pico ancho que se extiende desde la región de los 3500 a 3000 cm^{-1} , esta región es característica de la absorción de los grupos hidroxilo presentes en la muestra y del agua residual del proceso de secado, esta señal se observa claramente en la pectina cítrica y en las pectinas extraídas con y sin ultrasonido, en estas últimas, se presentan 3 picos mezclados: primero en $3580-3480\text{ cm}^{-1}$, segundo en $3333-3354\text{ cm}^{-1}$ y tercero en $3060-3020\text{ cm}^{-1}$, que son más distintivos en el tratamiento denominado blanco y a 15 min de extracción asistida con ultrasonido a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los dos primeros picos ($3500-3200\text{ cm}^{-1}$) son característicos de los alargamientos de los grupos N-H, la presencia de dos picos es característico de las aminas primarias. Una segunda evidencia de la presencia de grupos amino, son las bandas intensas en la región de $900-650\text{ cm}^{-1}$, que representan la flexión de los grupos N-H (Morrison y Boyd, 1998). El tercer pico presentado entre 1600 y 1500 cm^{-1} , es característico de los estiramientos del grupo C-H de anillos aromáticos, Coates (2000) menciona, que si existe la presencia de señales de intensidad media a fuerte entre 850 y 670 cm^{-1} , se puede confirmar la presencia de compuestos aromáticos. Lo anterior sugiere la presencia de una fracción de proteína en los extractos, así como de compuestos que contienen en su estructura anillos aromáticos.

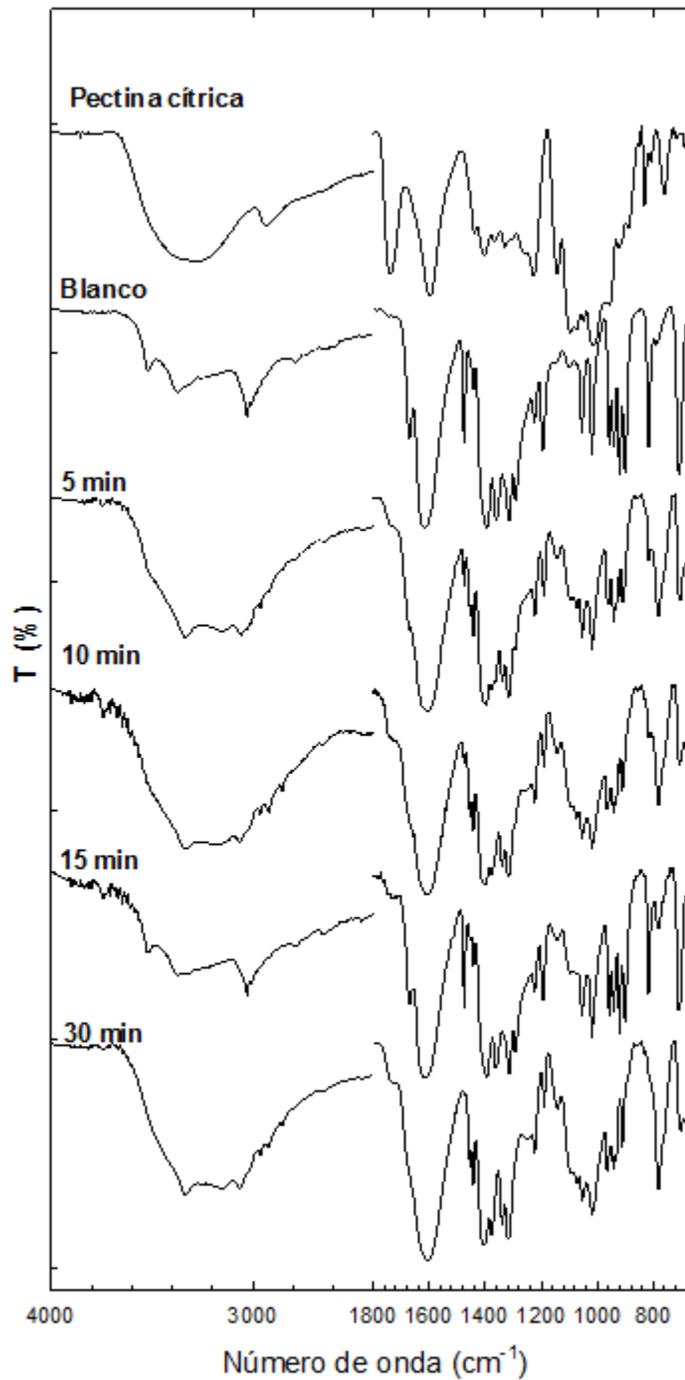


Figura 14. Espectros de infrarrojo con trasformada de Fourier de las pectinas sin purificar de la cáscara de tuna, comparados con pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436, DE= 55 a 70%) usada como referencia. Blanco; representa la extracción con agitación sin ultrasonido (2 h) y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido a **60 °C**.

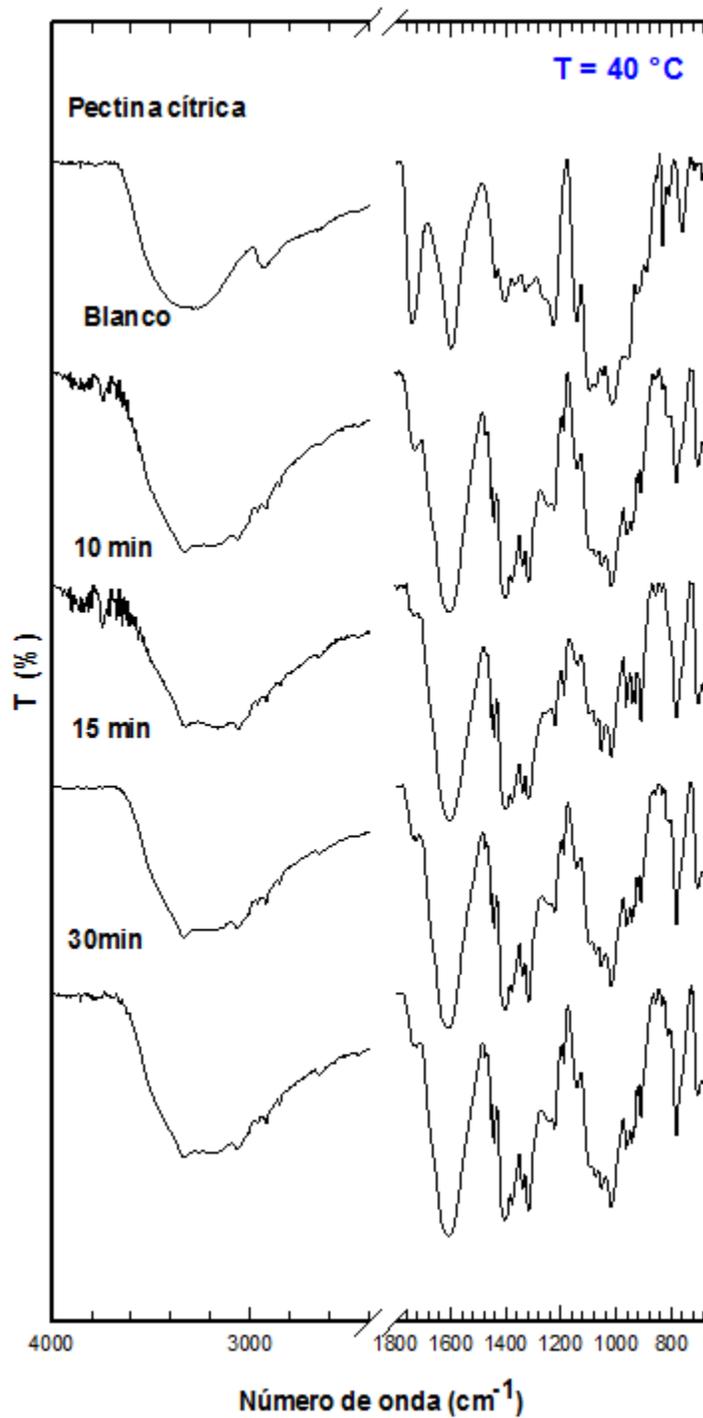


Figura 15. Espectros de infrarrojo con trasformada de Fourier de las pectinas sin purificar de la cáscara de tuna, comparados con pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%) usada como referencia. Blanco; representa la extracción con agitación sin ultrasonido (2 h) y 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido a 40 °C.

En la Figura 16 se presenta la región ampliada de 1800 a 1300 cm^{-1} de los espectros FTIR, donde se muestra el pico representativo de los grupos carboxilo esterificados (COO-R) a 1744 cm^{-1} (Košťálová, Hromádková & Ebringerová, 2013), este pico es más ancho y pequeño en los polisacáridos extraídos de cáscara de tuna que en la pectina cítrica usada como referencia; esto puede ser atribuido a una menor pureza en los extractos y a diferencias en el grado de esterificación. La pectina cítrica tiene un grado de esterificación de 55-70%, mientras que la pectina de cáscara de tuna es una pectina de bajo grado de esterificación (Lira-Ortiz et al., 2014). Por otra parte, se presentan en esta misma región los picos de los grupos carboxilo a 1611 y 1413 cm^{-1} , que son representativos de los estiramientos asimétricos y simétricos de estos grupos (Košťálová et al., 2013; Marry et al., 2000).

Košťálová et al., (2013), reportaron que la huella dactilar de las pectinas está representada por 5 picos característicos en la región de 1200-1000 cm^{-1} , estos picos se presentan en las longitudes de onda de 1145, 1103, 1077, 1050 y 1017 cm^{-1} , la presencia de estos cinco picos es una evidencia clara de la presencia de polisacáridos tipo pectina. En esta región es donde se presentan las vibraciones del anillo que se superponen con las vibraciones de estiramiento de grupos C-OH laterales y la vibración del enlace glucosídico (C-O-C) (Kačuráková, Capek, Sasinková, Wellner & Ebringerová, 2000). Estos resultados indican la presencia de polisacáridos tipo pectina debido a la presencia de grupos COO^- y COO-R (Figura 16) y las similitudes encontradas en la huella dactilar característica de estos polímeros (Figura 17). Estas similitudes son encontradas tanto en la pectina cítrica usada como referencia, como en los extractos obtenidos con o sin ultrasonido. Por lo que se confirma la naturaleza péctica de los extractos.

En los distintos tratamientos con ultrasonido fue evidente la presencia de compuestos no solubles en los polisacáridos extraídos. Incluso al incrementar la amplitud ultrasónica y/o el tiempo de aplicación de ultrasonido, las disoluciones acuosas de los extractos crudos presentaron mayor turbidez. El análisis de grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo, mostró los picos de transmitancia característicos de pectinas pero con posibles compuestos contaminantes, posiblemente de naturaleza proteínica. Debido a la presencia de impurezas, se procedió a separar los compuestos insolubles por centrifugación, el sobrenadante se precipitó y se lavó con etanol, y en lo sucesivo será denominado como “pectina clarificada”, mientras que el residuo de la centrifugación o parte insoluble será denominado simplemente como “residuo”.

En Cuadro 9 se presentan los promedios y la desviación estándar del contenido de proteína de las pectinas clarificadas y el residuo. Los resultados obtenidos en las pectinas clarificadas revelan la presencia de cantidades de proteína entre 1.17 a 3.7% y 4.4 a 7.2% para las muestras obtenidas con 30 y 90% de amplitud ultrasónica, respectivamente, lo que sugiere que a medida que aumenta la intensidad ultrasónica se favorece el proceso de extracción de polisacáridos y de proteína estructural de la pared celular. Por otra parte, los resultados obtenidos en los residuos, exhiben la presencia de una gran cantidad de proteína que se encuentra en un intervalo del 20 al 28%, estos resultados coinciden con los análisis de FT-IR realizados a los extractos crudos, en los cuales se evidencia la presencia de aminas primarias y secundarias, lo que indica la presencia de proteína en los extractos crudos. Estos hallazgos sugieren que dentro de los polisacáridos pécticos de cáscara de tuna, se encuentra el Arabinogalactano II (AGII) (ver Figura 4), el cual se encuentra asociado con proteínas (3-8%); y se ha reportado que en los procesos de extracción de pectinas se co-extraen (polisacárido y proteína), dificultando frecuentemente su separación (Voragen et al., 2009).

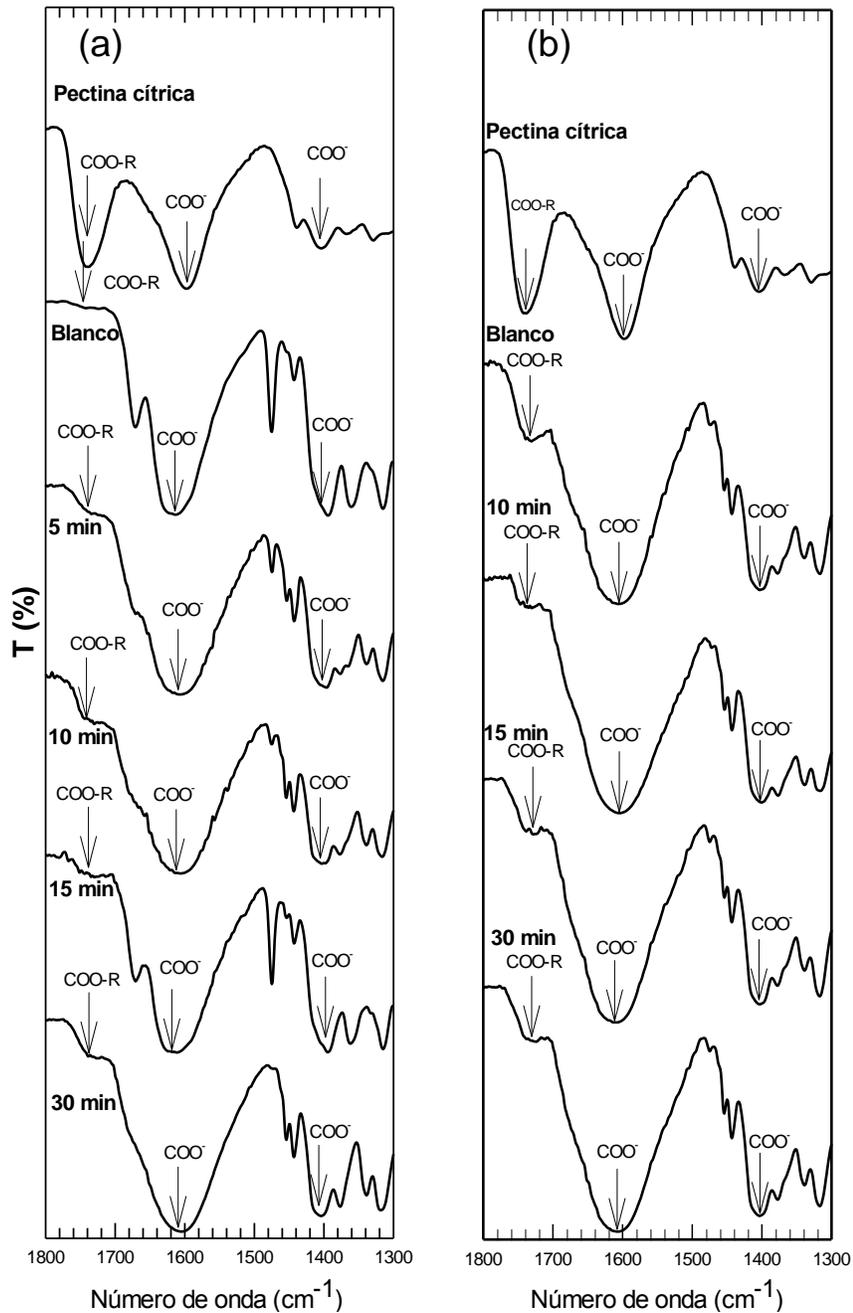


Figura 16. Región ampliada de los espectros FTIR. Se señalan los picos de absorción de los grupos COO-R (1744 cm^{-1}) y los grupos COO⁻ (1611 y 1413 cm^{-1} ; estiramientos asimétricos y simétricos respectivamente). Blanco: extracción sin acción del ultrasonido (2 h) y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido. Se muestra el espectro FTIR de una pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%) usada como referencia. (a) Extracciones realizadas a **60 °C** y (b) Extracciones realizadas a **40 °C**.

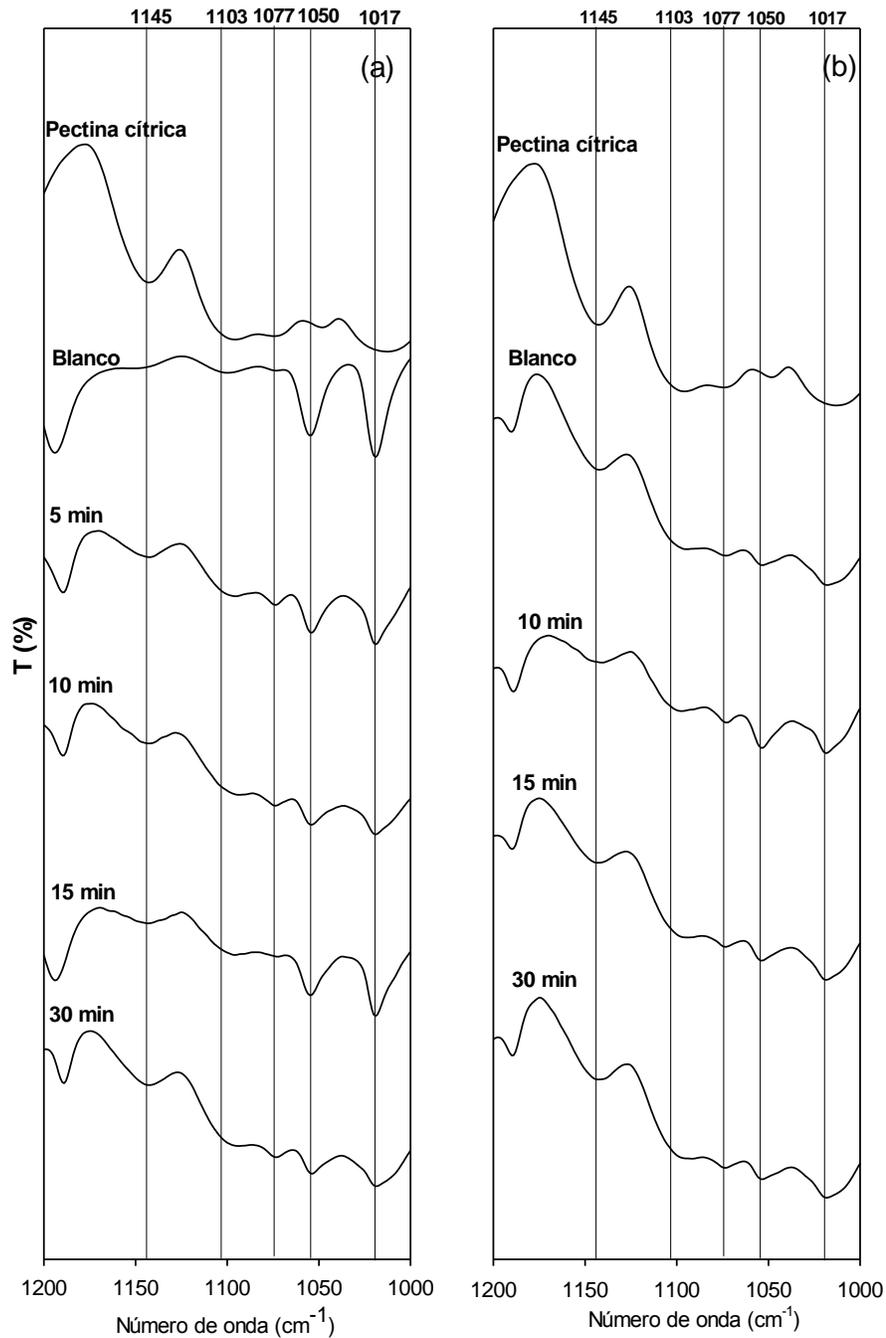


Figura 17. Región ampliada (1200-1000 cm⁻¹) de los espectros de FTIR, donde se puede observar la huella dactilar de las pectinas (1145, 1103, 1077, 1050 y 1017 cm⁻¹). Blanco; representa la extracción sin acción del ultrasonido (2 h) y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido. Se muestra el espectro FTIR de una pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%) usada como referencia. (a) Extracciones realizadas a **60 °C** y (b) Extracciones realizadas a **40 °C**.

Cuadro 9. Contenido de proteína en la fracción soluble e insoluble de polisacáridos extraídos de la cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.). Se presenta el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

Tratamiento	Ultrasonido	Amplitud Ultrasonónica (%)	t (min)	T (°C)	Proteína en fracción soluble de extractos (% p/p)	Proteína en fracción insoluble de extractos (% p/p)
Blanco 2	No	0	120	60	2.57 \pm 0.33	23.55 \pm 0.33
5	Si	30	5	60	2.57 \pm 0.33	25.65 \pm 0.0
6	Si	30	10	60	1.17 \pm 0.33	23.09 \pm 0.99
7	Si	30	15	60	2.57 \pm 0.33	27.28 \pm 0.33
8	Si	30	30	60	3.73 \pm 0.0	27.75 \pm 0.99
9	Si	90	5	60	4.43 \pm 0.33	21.22 \pm 0.33
10	Si	90	10	60	5.13 \pm 0.0	17.49 \pm 0.99
11	Si	90	15	60	4.90 \pm 0.33	19.59 \pm 0.0
12	Si	90	30	60	7.23 \pm 0.33	23.09 \pm 0.99

Segunda etapa: Análisis de pectinas clarificadas (purificadas)

En estos análisis al igual que en la primera etapa, los resultados se enfocaron en la identificación de los picos representativos de los grupos carboxilo, carboxilo esterificado y la huella dactilar de las pectinas. Las Figuras 18, 19 y 20 muestran los espectros FTIR completos para las distintas condiciones de extracción evaluadas en este trabajo y su comparación con la extracción convencional (blanco) y una pectina cítrica usada como referencia. En las tres figuras es evidente que los picos característicos que identifican la naturaleza péctica de la muestra se encuentran mejor resueltos y los espectros de las pectinas de tuna muestran mayor similitud con el espectro de la pectina de referencia.

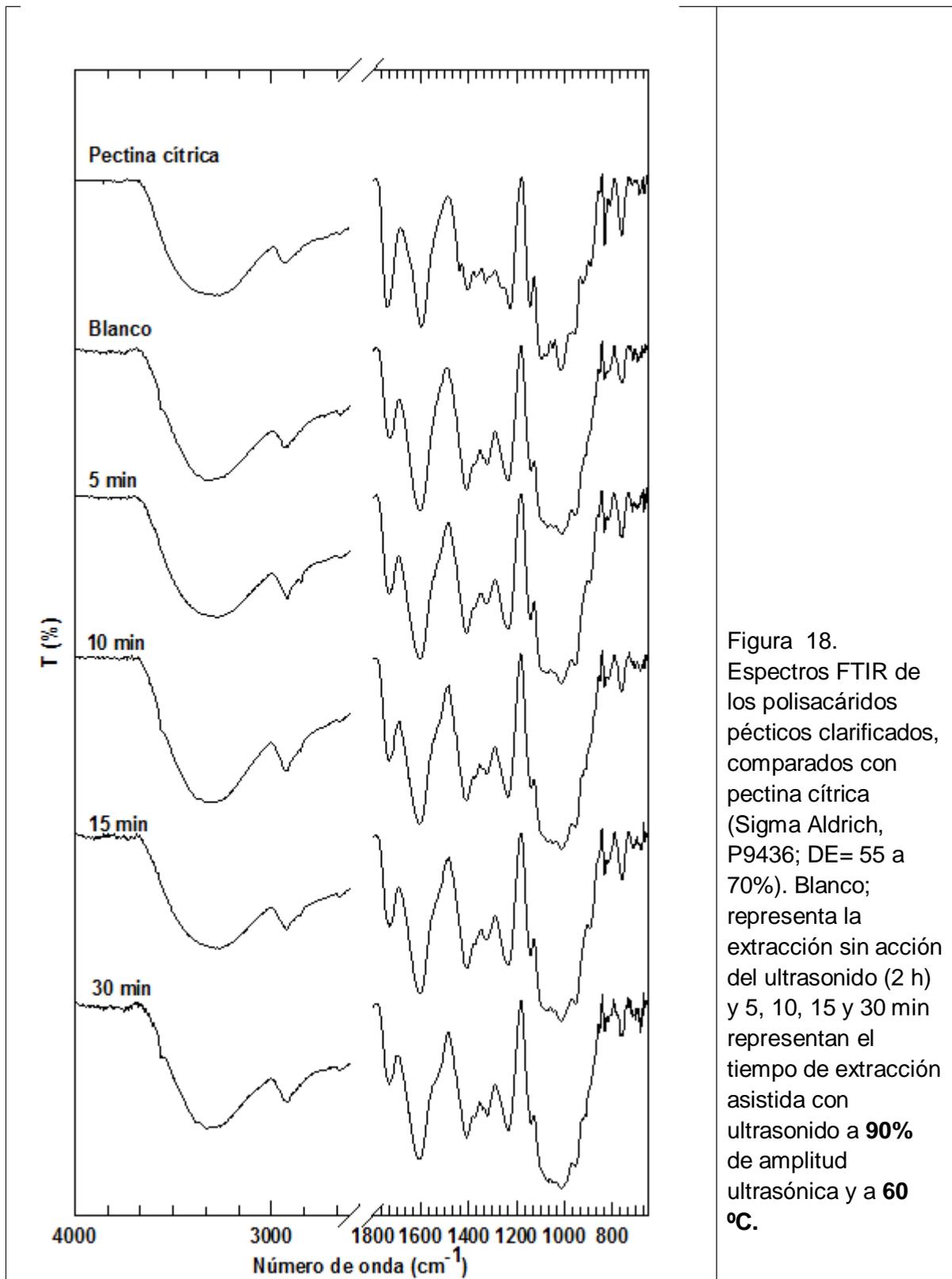


Figura 18. Espectros FTIR de los polisacáridos pécticos clarificados, comparados con pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%). Blanco; representa la extracción sin acción del ultrasonido (2 h) y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido a **90%** de amplitud ultrasónica y a **60 °C**.

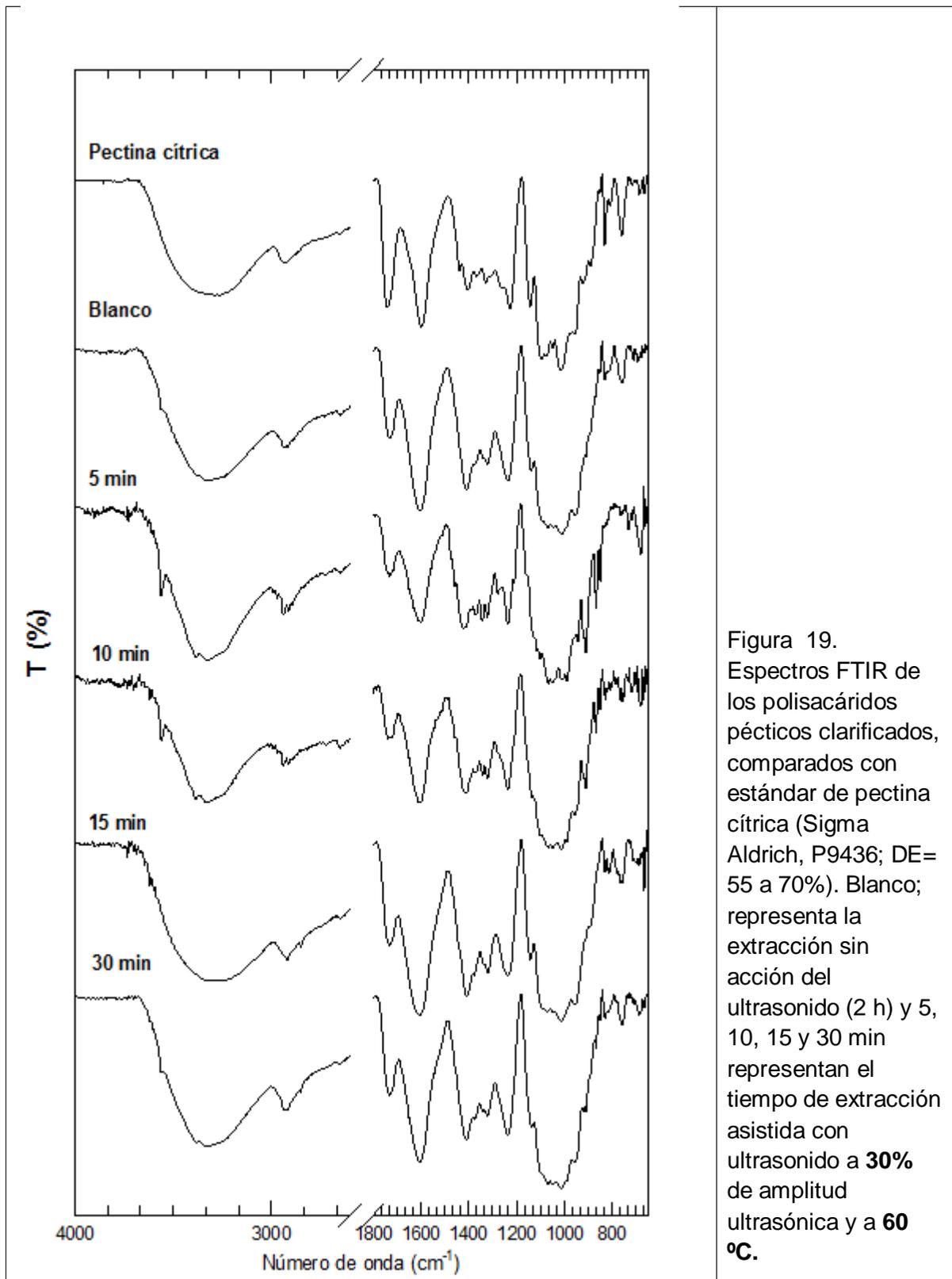


Figura 19. Espectros FTIR de los polisacáridos pécticos clarificados, comparados con estándar de pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%). Blanco; representa la extracción sin acción del ultrasonido (2 h) y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido a 30% de amplitud ultrasónica y a 60 °C.

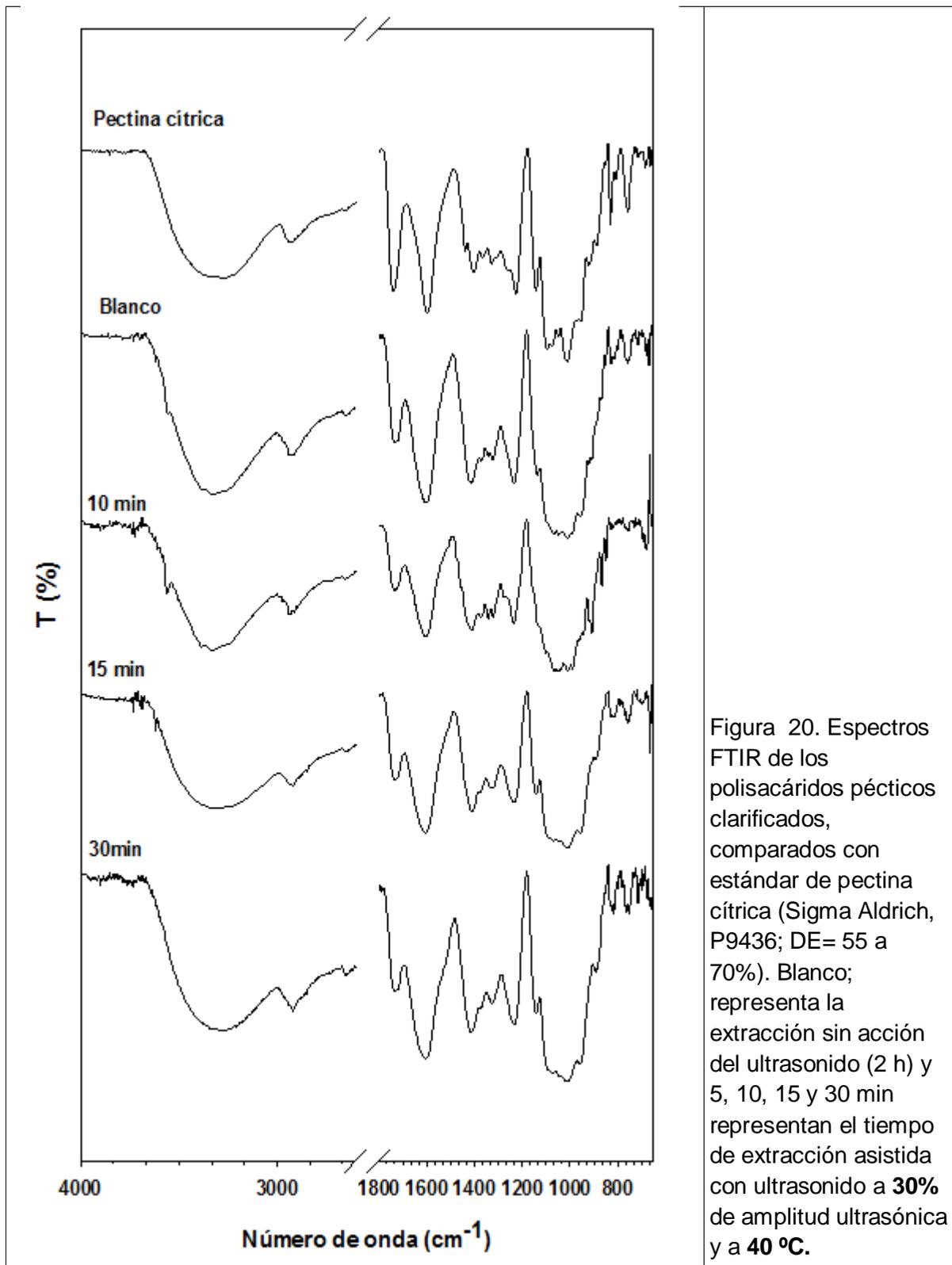


Figura 20. Espectros FTIR de los polisacáridos pécicos clarificados, comparados con estándar de pectina cítrica (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%). Blanco; representa la extracción sin acción del ultrasonido (2 h) y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido a 30% de amplitud ultrasónica y a 40 °C.

En la Figura 21 se presenta nuevamente la región ampliada de 1800 a 1300 cm^{-1} de los espectros de FTIR, donde se encuentran expresados los picos representativos de los grupos carboxilo esterificados (COO-R) a 1744 cm^{-1} (Košťálová et al., 2010) y los grupos carboxilo a 1611 y 1413 cm^{-1} (estiramientos asimétricos y simétricos respectivamente) (Košťálová et al., 2010; Marry et al., 2000). En estos picos se puede apreciar, a diferencia de los espectros de polisacáridos sin clarificar (primera etapa), mejor definición y picos más delgados, lo que permite diferenciar mejor cada uno de los grupos estudiados. El pico característico para los grupos carboxilo esterificados (1744 cm^{-1}) se encontraba oculto en los espectros de la primera etapa debido principalmente a la mezcla de señales en la región de 1600 cm^{-1} , donde además de presentarse las señales de los grupos carboxilo se presentan las señales de los grupos amino pertenecientes a las proteínas existentes en los extractos crudos, lo cual se confirmó con el análisis de proteína (Cuadro 9).

En la región comprendida de 1200-1000 cm^{-1} (Figura 22) se siguen presentando los 5 picos característicos (1145, 1103, 1077, 1050 y 1017 cm^{-1}) de la huella dactilar de las pectinas, es posible observar que esta región es más clara y más parecida a los espectros de la pectina cítrica usada como referencia, por lo que los resultados indican la presencia de polisacáridos tipo pectina debido a la presencia de grupos COO^- y COO-R y las similitudes encontradas a la huella dactilar característica de estos polímeros. Estas similitudes con la pectina cítrica usada como referencia son presentadas por los polisacáridos extraídos con o sin ultrasonido.

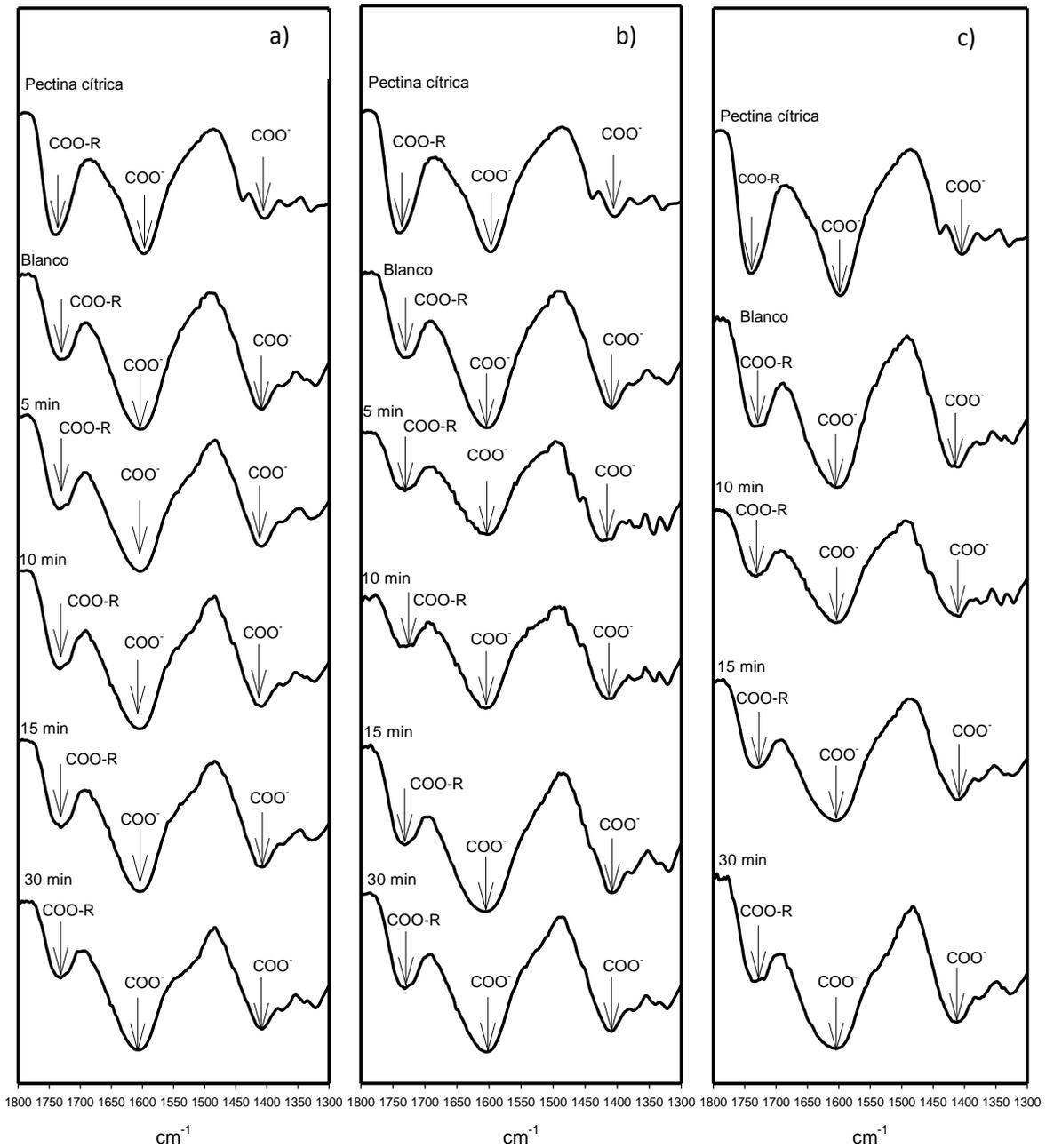


Figura 21. Región ampliada de $1800\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ de los espectros de FTIR de los extractos clarificados, donde se puede observar los picos de absorción de los grupos COO-R (1744 cm^{-1}) y los grupos COO⁻ (1611 y 1413 cm^{-1} ; estiramientos asimétricos y simétricos respectivamente). Blanco; representa la extracción con agitación sin acción del ultrasonido durante 2 h y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido, comparados con una pectina cítrica usada como referencia (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%). (a) 90% de intensidad a 60 °C, (b) 30% de intensidad a 60 °C y c) 30% de intensidad a 40 °C.

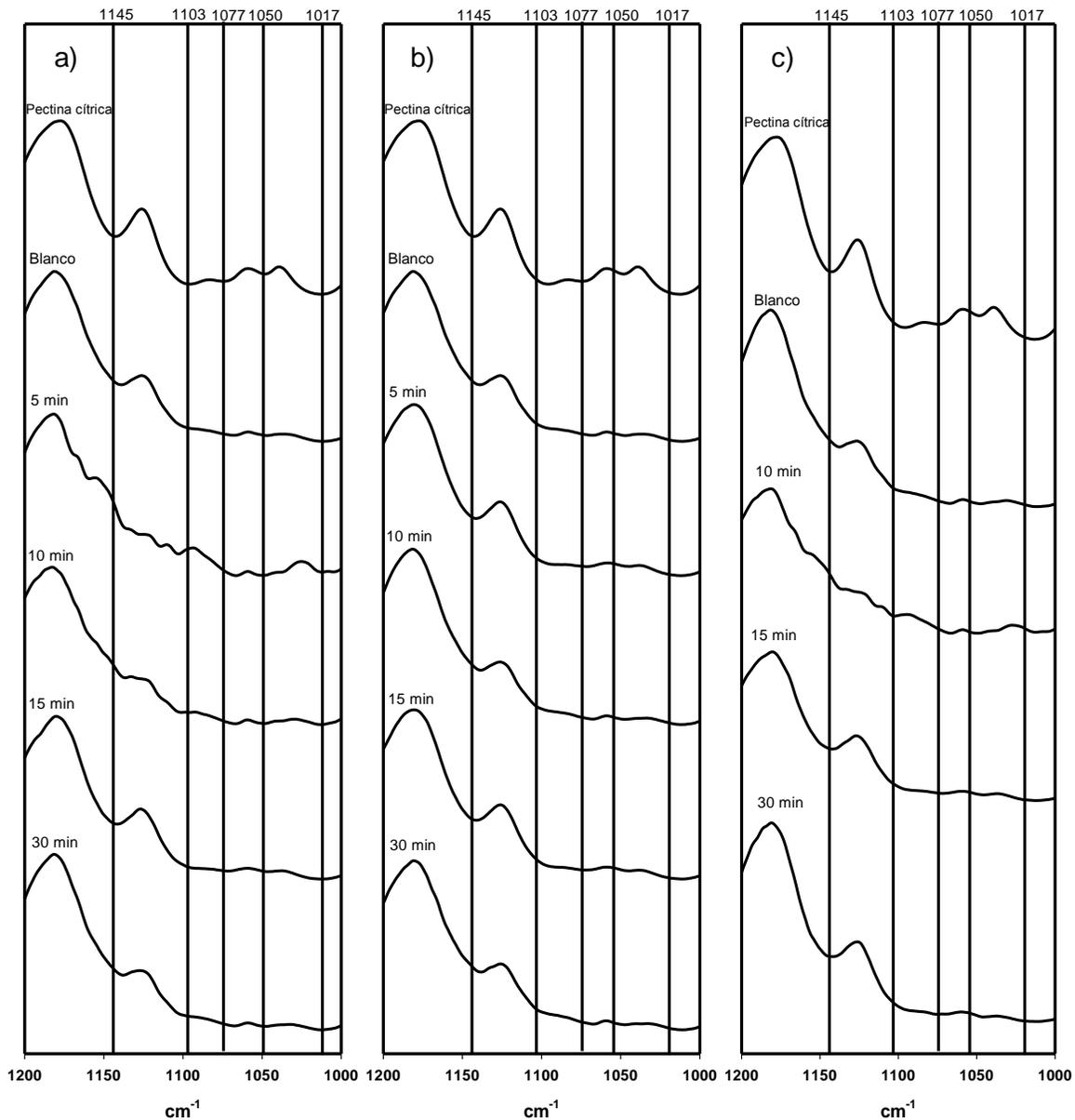


Figura 22. Región ampliada de 1200-1000 cm^{-1} de los espectros de FTIR, donde se puede observar la huella dactilar de las pectinas (1145, 1103, 1077, 1050 y 1017 cm^{-1}). Blanco; representa la extracción con agitación sin acción del ultrasonido durante 2 h y 5, 10, 15 y 30 min representan el tiempo de extracción asistida con ultrasonido, comparados con una pectina cítrica usada como referencia (Sigma Aldrich, P9436; DE= 55 a 70%). (a) 90% de intensidad a 60 °C, (b) 30% de intensidad a 60 °C y c) 30% de intensidad a 40 °C.

8.2.2 Distribución de pesos moleculares

En el Cuadro 10 se muestran los pesos moleculares de las pectinas obtenidas con ultrasonido de alta intensidad, 30% AU a 40 °C y 60 °C, y 90% AU a 60 °C; así como los obtenidos por extracción convencional a 40 °C y 60 °C. Los resultados revelan que aun cuando las muestras en solución fueron filtradas a través de membranas de 0.2 µm para remover posibles agregados, se obtuvieron pesos moleculares promedio cercanos a 1.8×10^6 Da con fracciones que oscilan en valores de 1.4×10^6 a 2.1×10^6 Da.

En las pectinas extraídas a 40 °C con 30% AU y distintos tiempos de ultrasonido, no se observaron diferencias importantes en los pesos moleculares promedios (1706 a 1772 kDa). Sin embargo, al comparar los pesos moleculares de esos polisacáridos con el correspondiente al polisacárido obtenido a través de la extracción convencional, se observa una ligera disminución en este último (1662 kDa), esto debido probablemente a que la extracción convencional se llevó a cabo en un periodo de tiempo más largo (2 h), lo cual pudo ser suficiente para recuperar fracciones más pequeñas o fracciones que difunden más lentamente de la pared celular de la cáscara de tuna. El incremento en la temperatura de extracción a 60 °C, con la misma amplitud ultrasónica (30%) no dio lugar a cambios importantes en el peso molecular promedio de los polisacáridos extraídos. Los valores fueron similares a los obtenidos con 30% AU y 40 °C, con excepción del tratamiento P103060, en donde sí se observa una disminución en el peso molecular promedio (1488 kDa), lo cual es difícil explicar. De forma similar a los tratamientos a 40 °C, la extracción convencional (60 °C, 2 h sin ultrasonido) generó pectinas con mayor peso molecular promedio (1801 kDa). En general, se puede afirmar que el uso de ultrasonido de alta intensidad con 30% AU en la extracción de pectinas de la cáscara de tuna, no generó cambios en el peso molecular de éstos, tanto a 40 °C como a 60 °C.

Cuadro 10. Distribución de peso molecular de las pectinas extraídas de la cáscara de tuna (*O. albicarpa* S.)

Condiciones experimentales		Clave de la muestra	M _w (kDa)	%	M̄ _w (kDa)			
T = 40 °C	Extracción convencional T= 40 °C	P1200040	1562.8	51.1	1662.38			
			1879.5	40.8				
			752.5	8.1				
	30% AU	P103040	1562.3	56.4	1717.14			
1911.9			42.3					
2090.7			1.3					
1701.7			98.8					
30% AU	P153040	2110.4	1.16	1706.5				
		1776.5	99.2					
		1283.6	0.8					
		1772.6						
T = 60 °C	Extracción convencional T= 60 °C	P1203060	1549.4	33.0	1801.0			
			1767.3	17.0				
			2012.0	46.7				
			1489.5	3.3				
	30% AU	P053060	1763.5	98.7	1762.4			
			1678.9	1.3				
			1464.2	94.7				
			1972.1	2.4				
			1882.7	2.9				
			30% AU	P153060		1585.4	52.6	1786.7
						1905.1	23.0	
						2119.2	23.6	
						1837.8	0.8	
			30% AU	P303060		1597.4	64.0	1712.4
1939.3	34.7							
1337.5	1.3							
1846.3	100							
1621.0	45.6							
1918.0	19.8							
90% AU	P109060	1396.5	4.6	1810.3				
		1724.9	99.2					
		1933.1	0.8					
		1654.0	95.2					
90% AU	P159060	2038.8	1.3	1726.5				
		1058.2	3.5					

En los procesos de extracción con 90% AU y 60 °C, se observó una disminución del peso molecular promedio de las pectinas de tuna a medida que aumentó el tiempo de proceso, es decir, se presentó una depolimerización debido a la acción del ultrasonido que no sucede al utilizar 30% AU. Este efecto de disminución del peso molecular por efecto de la aplicación de ultrasonido de alta intensidad ha sido reportado por diversos autores en soluciones de pectinas comerciales

(Zhang, Ye, Ding, et al., 2013a; Zhang, Ye, Xue, et al., 2013b), pectinas de uva extraídas con la asistencia de ultrasonido (Bagherian et al., 2011), quitosano comercial (Baxter, Zivanovic & Weiss, 2005) y carboximetilcelulosa (Grönroos et al., 2008), entre otros polisacáridos. En décadas pasadas se reportaron diversos estudios en donde se evidencia que la exposición prolongada de soluciones macromoleculares a ondas de ultrasonido de alta energía genera una disminución de la viscosidad de éstas, sin cambios en la naturaleza química de la macromolécula; lo cual se asume se debe a la ruptura de enlaces covalentes susceptibles de la cadena polimérica (Kardos & Luche 2001; Lorimer, 1995). El mecanismo exacto de la degradación del peso molecular por ultrasonido de alta intensidad es aún materia de debate (Grönroos et al., 2001) sin embargo se asocia a:

1. Fuerzas hidrodinámicas de cavitación (energía liberada en la implosión de burbujas).
2. Esfuerzos cortantes en la interface de burbujas pulsantes.
3. El incremento en la temperatura y la presión en las burbujas generadas en la cavitación.

De acuerdo a lo reportado por Grönroos et al., (2008), las fuerza hidrodinámicas se pueden originar como resultado del incremento en las fuerzas de fricción entre las moléculas del disolvente, las cuales se mueven rápidamente y son aceleradas por efecto del ultrasonido, y las macromoléculas poliméricas, menos móviles debido a su tamaño. Las fuerzas hidrodinámicas también se asocian con el colapso de las burbujas de cavitación. Grönroos et al., estudiaron el efecto del peso molecular inicial de soluciones de carboximetilcelulosa sonicadas a 40 °C, 23 kHz, con una potencia ultrasónica de 80 W/L y con tiempos de exposición hasta 3 h. De acuerdo con este estudio, la degradación de carboximetilcelulosa en solución acuosa, dependía principalmente de la viscosidad dinámica inicial de la solución, cuanto mayor es ésta, mayor es la degradación del peso molecular. Esto fue interpretado en términos de mayor intensidad de la cavitación cuando se incrementa la viscosidad del medio.

En otros estudios (Czechowska-Biskup et al., 2005) se evaluó el efecto del ultrasonido de alta intensidad en la degradación de soluciones de quitosano y almidón, demostrando que la depolimeración de estos polisacáridos depende no sólo de la concentración del polímero, también afectan la potencia de la onda ultrasónica y el gas disuelto en la solución polimérica; estos últimos están estrechamente relacionados con el fenómeno de cavitación que genera fuerzas hidrodinámicas capaces de destruir las cadenas poliméricas y formar radicales libres que provocan la ruptura de las cadenas principales por reacciones secundarias con el enlace glucosídico, formando grupos carbonilo. Por otra parte, estas reacciones secundarias entre los radicales libres y los polisacáridos se ven afectadas por la conformación de la cadena principal, siendo más susceptibles las cadenas lineales como el caso del quitosano y menos eficaces en cadenas enrolladas como el caso del almidón.

Se sabe que la cavitación en líquidos se debe a rarefacción y compresión de burbujas, durante la rarefacción se generan presiones negativas que deben superar a las fuerzas de cohesión presentes en el líquido. Si la amplitud ultrasónica es alta, las burbujas crecen y colapsan dentro de pocos ciclos acústicos, al desintegrarse se forman burbujas más pequeñas. Estas burbujas pequeñas pueden estallar rápidamente o recuperarse iniciando un nuevo ciclo de rarefacción y compresión, a este fenómeno se le denomina cavitación inestable o transitoria. Este fenómeno puede provocar un aumento en la intensidad del fenómeno de cavitación, haciendo que el proceso global sea más intenso y violento (Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T. & Barbosa-Cánovas G. V., 2011). Por lo tanto, con base en lo revisado en la literatura, se puede asumir que la depolimerización de la pectina de tuna observada en las extracciones con una amplitud de onda ultrasónica de 90%, se debe a la generación de un fenómeno de cavitación más intenso que es capaz de dañar todas las estructuras o polímeros presentes en el medio de extracción.

En otros trabajos (Zhang et al., 2013a), se ha verificado la depolimerización de pectinas de manzana ($M_w=700$ kDa), usando amplitudes ultrasónicas (AU) desde 20 hasta el 60%, 20 kHz de frecuencia con tiempos de exposición hasta 60 min y temperaturas desde 5 hasta 25 °C; observando, igual que este trabajo, que al aumentar el % AU se presenta una mayor disminución del peso molecular de las pectinas en función del tiempo de ultrasonicación. También se enfatiza en el trabajo de Zhang et al. (2013a), que los tratamientos con ultrasonido no alteraron la estructura primaria de las pectinas, lo cual se confirmó a través de análisis de HPLC, IR y NMR.

Los pesos moleculares obtenidos en este trabajo son similares a los reportados previamente (Lira-Ortiz et al., 2014) para pectinas de tuna extraídas con las condiciones que en el presente trabajo denominamos “extracción convencional”. Lira-Ortiz et al., reportaron tres fracciones mayoritarias en los extractos de pectinas: 1114 kDa (80.45%), 655 kDa (10.55%) y 558 kDa (9%). El peso molecular promedio fue 1016 kDa y el índice de polidispersidad fue de 1.116. Por otra parte, Majdoub et al., (2001) determinaron el peso molecular de diferentes polisacáridos extraídos de la pulpa de nopal, piel de nopal y cáscara de tuna de *Opuntia ficus-indica*. Estos autores utilizaron un proceso de extracción acuosa a temperatura ambiente, pH de 6.2 y ultrafiltración (Corte molecular: 100 kDa); y reportaron pesos moleculares de 6.1×10^3 kDa, 3.5×10^3 kDa y 2.3×10^2 kDa, para polisacáridos pécticos de pulpa de nopal, piel de nopal y cáscara de tuna, respectivamente.

8.2.3 Determinación de ácido galacturónico, azúcares neutros, grupos acetilo y grupos metoxilo de las pectinas extraídas

En el Cuadro 11 se muestran los contenidos de ácido galacturónico, grupos acetilo, grupos metoxilo y azúcares neutros en las pectinas clarificadas obtenidas de la cáscara de tuna. Las determinaciones se realizaron principalmente en las pectinas extraídas a 60 °C, debido a que los procesos de extracción a 40 °C generaron muestras pequeñas, insuficientes para completar las determinaciones. Adicionalmente, como se ha discutido antes, los procesos de extracción a 40 °C no resultaron de interés para este estudio debido a los bajos rendimientos de extracción obtenidos.

Los datos del Cuadro 11 muestran valores menores a los esperados para pectinas, principalmente en lo concerniente a ácido galacturónico y pocos azúcares neutros detectados, en donde sorprende que no se detecta galactosa, uno de los azúcares neutros principales de esta pectina (Lira-Ortiz et al., 2014). Estos resultados pudieron deberse a las condiciones de hidrólisis usadas para analizar las muestras de pectina (ver sección 7.3). Estudios realizados en pectinas (Garna, Mabon, Nott, Wathélet & Paquot, 2006) han demostrado que la hidrólisis de estas macromoléculas con ácidos fuertes como H₂SO₄ y HCl a temperaturas de 100 °C, está lejos de ser ideal para destruir los enlaces de las cadenas de ácido galacturónico y para cuantificar con exactitud el contenido de este compuesto. Este tipo de hidrólisis parece combinar dos fenómenos simultáneos: en primer lugar la liberación de ácido galacturónico como un producto de la hidrólisis de la pectina y en segundo lugar, la degradación del ácido galacturónico liberado bajo la acción del ácido inorgánico y el calor. Por lo que los resultados presentados en este trabajo pudieran estar subestimados, posiblemente la hidrólisis no fue completa y por lo tanto no se cuantificaron completamente ni el ácido galacturónico ni los azúcares neutros de la molécula, por lo que será necesario en

estudios posteriores optimizar este proceso de hidrólisis previo al análisis químico de las muestras. Sin embargo, como las muestras fueron tratadas bajo las mismas condiciones y de forma simultánea, la principal relevancia en analizar los datos del Cuadro 11 radica en la tendencia que tienen éstos y las diferencias entre los tratamientos.

Los resultados de las pectinas extraídas a 60 °C muestran que el uso de ondas ultrasónicas durante la extracción incrementó el contenido de ácido galacturónico en el polímero a medida que aumentó el tiempo de extracción, incluso el contenido de ácido galacturónico en las muestras obtenidas con ultrasonido fue mayor a la pectina extraída sin ultrasonido. Esto muestra un efecto positivo del ultrasonido sobre la extracción de pectinas, posiblemente el efecto de cavitación permita una difusión más eficiente del EDTA en la pared celular de la cáscara de tuna, lo cual promueve una liberación mayor de pectinas unidas con calcio presentes en la pared celular. Otra hipótesis es la posible des-ramificación o disminución del tamaño de las cadenas laterales de las pectinas, por efecto del ultrasonido durante el proceso de extracción, permitiendo así que la hidrólisis con ácidos fuertes (H₂SO₄ y HCl), durante la preparación de las muestras para el análisis de ácido galacturónico y azúcares neutros, fuera más eficaz, dando lugar a valores de estos componentes más cercanos a los reales.

Por otra parte, los resultados de análisis de azúcares neutros muestran que los azúcares típicos de las pectinas de tuna de este trabajo son: glucosa, ramnosa y arabinosa, sin ser detectada galactosa y predominando en todos los tratamientos la ramnosa. El predominio de ramnosa y arabinosa establece la presencia de cadenas de ramnogalacturano I y II y son claros indicios de zonas ramificadas en la estructura de las pectinas extraídas (sección 2.5.1). La ausencia o no detección de galactosa en las pectinas extraídas en este trabajo puede ser resultado de la eliminación del residuo no soluble durante la etapa de clarificación de las pectinas.

En la sección 8.2.1 se discutió que es frecuente coextraer arabinogalactano II (polisacárido péctico rico en galactosa) con proteína estructural, los cuales son difíciles de separar (Voragen et al., 2009); por lo tanto, posiblemente la galactosa presente en la pectina de tuna se eliminó de las pectinas clarificadas durante la separación de la fracción no soluble de éstas. En trabajos previos con pectina de tuna se han cuantificado como azúcares principales, galactosa, ramnosa y arabinosa (Cuadro 12), pero en ninguno de estos trabajos se realizó una separación de fracciones insolubles como la realizada en este trabajo, sólo se llevaron a cabo lavados como parte del proceso de purificación.

El contenido molar de grupos metoxilo en las pectinas extraídas de la cáscara de tuna confirma que pertenecen al grupo de “pectinas de bajo metoxilo”. Estos grupos metoxilo mostraron una disminución al incrementar el tiempo y la amplitud del ultrasonido: Esta des-metoxilación de pectinas por efecto del ultrasonido ha sido reportada con anterioridad por otros autores (Panchev, 1994; Zhang et al., 2013a) y se presume se debe al incremento de fuerzas de cizalla por el movimiento rápido del solvente durante la cavitación, lo cual posiblemente genere el rompimiento de enlaces químicos dentro de la estructura de la pectina. Sin embargo, se requieren más estudios que permitan identificar las reacciones que llevan a cabo durante la ultrasonicación de estos polímeros. Por otra parte, la presencia de grupos acetilo en estas pectinas puede ser de interés tecnológico, debido a que se ha demostrado que la presencia de estos grupos en pectinas de remolacha azucarera le confiere propiedades de superficie a la molécula; por lo tanto la presencia de acetilos puede resultar en mayor valor agregado de la pectina de tuna.

Cuadro 11. Contenido de ácido galacturónico, grupos acetilo, grupos metoxilo y azúcares neutros de las pectinas de tuna extraídas por ultrasonido de alta intensidad.

Muestra	Ácido galacturónico (mg/g)	Grupos acetilo (% mol)**	Grupos metoxilo (% mol)**	Azúcares neutros (mg/g)					
				Glucosa	Ramnosa	Arabinosa	Ramnosa/ácido galacturónico	Total	
Extracción convencional, 40 °C	ND	ND	ND	0.5	59.0	19.4	ND	78.9	
30% de amplitud ultrasónica	P103040	ND	ND	3.7	76.8	26.2	ND	106.7	
	P153040	ND	ND	6.4	77.4	21.6	ND	105.4	
	P303040	ND	ND	8.3	82.7	23.2	ND	114.2	
Extracción convencional, 60 °C	460.9	3.19	10.64	1.1	47.9	19.2	0.104	68.2	
30% de amplitud ultrasónica	P053060	473.5	1.73	25.53	2.4	55.2	18.8	0.117	76.4
	P103060	509.2	1.39	19.80	2.1	63.6	25.8	0.125	91.6
	P153060	518.4	1.50	10.26	5.3	57.2	16.7	0.110	79.2
	P303060	542.2	17.79	7.35	7.5	60.5	15.7	0.111	83.8
90% de amplitud ultrasónica	P059060	497.0	7.03	11.03	3.0	63.7	17.3	0.128	84.0
	P109060	570.9	1.23	2.04	7.7	66.1	22.8	0.116	96.6
	P159060	468.3	1.70	2.80	3.2	64.7	21.3	0.138	89.2
	P309060	488.0	1.73	7.36	12.5	82.1	22.8	0.168	117.4

*Datos de ácido galacturónico calculados sin considerar el contenido de proteína en las muestras. ** Los datos se expresan en función del contenido molar de ácido galacturónico.

Cuadro 12. Azúcares neutros y ácido galacturónico de pectinas extraídas de cáscara de tuna (*Opuntia* spp.).

Fuente	A Gal (mg/g)	Azúcares neutros (mg/g) ^a					DE (%)	Referencia
		Glu	Xil	Gal	Ram	Ara		
Cáscara de tuna (<i>O. albicarpa</i>)	654	1.20	ND	195.0	21.6	1.20	30.7	Lira-Ortiz et al., 2014
Cáscara de tuna (<i>O. ficus-indica</i>)	643	25	21	222 ^b		58	20.4	Forni et al., 1994
Cáscara de tuna (<i>O. ficus-indica</i>)	518	0	0	0	482	0	32	Majdoub et al., 2001
Cáscara de tuna (<i>O. ficus-indica</i>)	645 ^c	-	9	40	37	172	NR	Habibi et al., 2004

A Gal: ácido galacturónico, Glu: glucosa, Xil: xilosa, Gal: galactosa, Ram: ramnosa, Ara: arabinosa. ND: no detectado, NR: no reportado. DE: grado de esterificación.

^a Referido al peso seco del extracto.

^b Determinado como: Gal + Ram.

^c Reportado como ácidos urónicos.

8.4 Caracterización reológica

8.4.1 Pruebas de cizalla estacionaria

Las Figuras 23 y 24 muestran las curvas de viscosidad a 25 °C, de disoluciones al 2% p/p de pectina extraída de la cáscara de tuna. Sólo se presentan los datos de los polisacáridos extraídos a 60 °C debido a que las extracciones realizadas a 40 °C generaron tamaños de muestra muy pequeños que limitaron los ensayos de reometría. En la Figura 23 se muestran los resultados de los polisacáridos extraídos con 30% de intensidad ultrasónica. Las disoluciones acuosas de los polisacáridos extraídos presentaron un comportamiento no newtoniano que se ajustó al Modelo de Ostwald-de Waele. En contraste, la extracción convencional generó polisacáridos que presentan en dispersión acuosa, un comportamiento reológico que se ajustó aceptablemente al modelo de Cross de tres parámetros ($\eta_{\infty}=0$), con valores de viscosidad aparente inferiores a los polisacáridos extraídos con asistencia de ultrasonido. En el Cuadro 13 se resumen los valores de los parámetros reológicos, obtenidos del mejor ajuste de los datos experimentales a los modelos Ostwald-de Waele o Cross.

Las disoluciones acuosas de las pectinas de tuna, obtenidas con extracción asistida con ultrasonido (EAUS) usando 30% de amplitud ultrasónica, presentaron índices de consistencia (K) desde 1.76 Pa s^{0.58} (5 min de EAUS) hasta 0.60 Pa s^{0.74} (15 min de EAUS). El incremento en el tiempo de ultrasonicación, hasta 15 min, disminuyó el valor de K, pero el uso de 30 min de ultrasonicación en la extracción aumentó ligeramente el valor de K a 0.84 Pa s^{0.65}. Por otra parte, el índice de flujo (n) incrementó con el tiempo de proceso, la extracción con 5 min de ultrasonicación presentó valores de 0.58±0.014, el cual indica un comportamiento moderadamente pseudoplástico, este índice de flujo aumentó hasta 0.74±0.016 en los polisacáridos obtenidos con 15 min de ultrasonicación. Este comportamiento

denota una tendencia a disoluciones menos pseudoplásticas a medida que se incrementa el tiempo de ultrasonido en la extracción. En contraste, el uso de 30 min de ultrasonicación disminuyó ligeramente el valor de n a 0.65. El comportamiento del índice de flujo e índice de consistencia muestran que la EAUS con 30% de amplitud, influye en las propiedades de flujo a medida que se aumenta el tiempo de proceso, generando en tiempos cortos (i.e 5 min) polisacáridos que presentan los valores más altos de viscosidad aparente y de pseudoplasticidad; al aumentar el tiempo de extracción, la viscosidad y pseudoplasticidad disminuyen ligeramente; esta tendencia se observó en los tiempos de proceso de 5 a 15 min, las propiedades reológicas de los polisacáridos obtenidos con 30 min de ultrasonicación no siguen esta tendencia, presentan valores intermedios entre los polisacáridos obtenidos con 10 y 15 min de ultrasonicación.

El comportamiento reológico al flujo de los polímeros está en función de su concentración, peso molecular y grado de ramificación. Se ha reportado que las pectinas poseen ramificaciones en sus cadenas principales, dando lugar a una estructura compleja y muy ramificada (Willats, Knox & Mikkelsen, 2006). Estas ramificaciones pueden favorecer entrecruzamientos, “*entanglements*” a través de interacciones moleculares de baja energía (interacciones tipo van der Waals) que limitan el flujo y por lo tanto, las disoluciones presentan viscosidades altas cuando se someten a cizallas bajas (Hwang & Kokini, 1992).

En el caso de las pectinas extraídas con 30% de amplitud ultrasónica, el peso molecular de los distintos tiempos de exposición a ultrasonido, no generó resultados dramáticos en el peso molecular (a excepción del tiempo de 10 min) pero posiblemente la cavitación generada durante la extracción asistida con ultrasonido, generó cambios en el tamaño y el patrón de distribución de las cadenas laterales de la pectina, lo cual no es factible determinar con los análisis

realizados en este trabajo. De hecho existen trabajos en polímeros sintéticos que discuten el efecto de las cadenas laterales en la reología de polímeros pero pocos trabajos lo han hecho con polisacáridos (Hwang & Kokini, 1992).

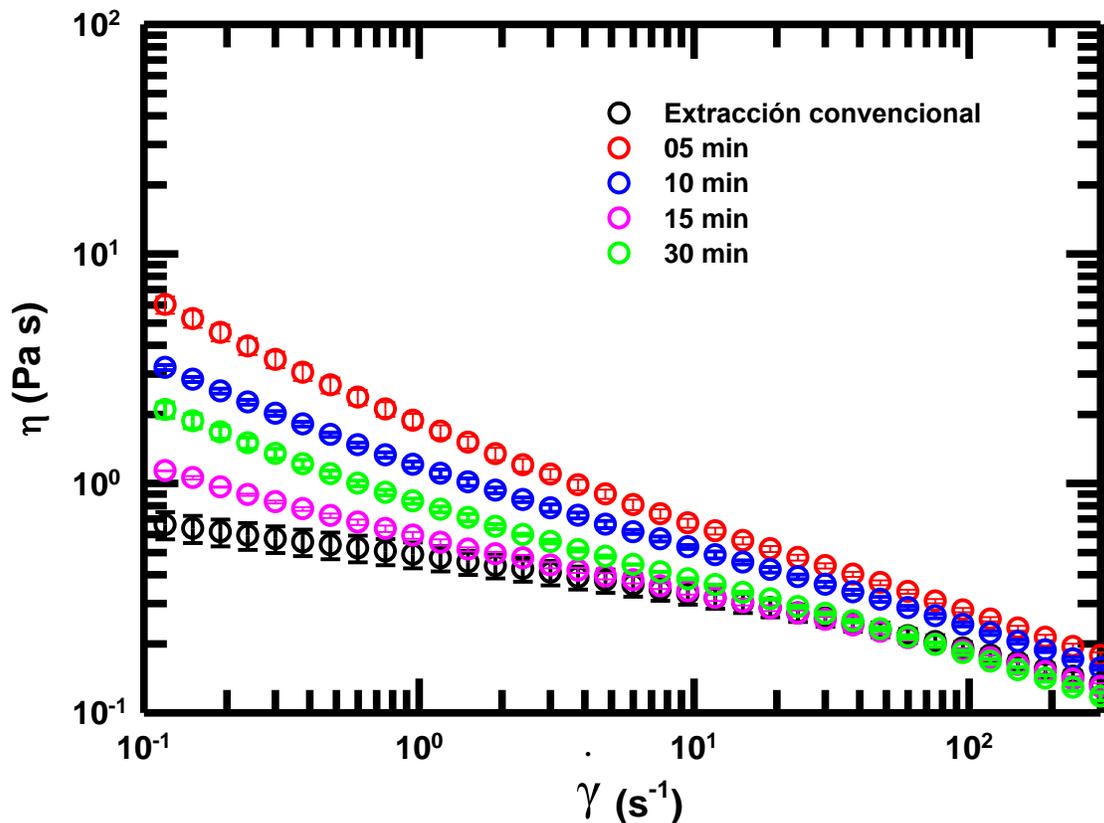


Figura 23: Curvas de viscosidad de pectinas de cáscara de tuna al 2% p/p y 25 °C. Extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad, 30% de amplitud a 60 °C. Se muestran los resultados para diferentes tiempos de ultrasonificación y la extracción en tanque agitado a 60 °C, 2 h sin ultrasonido “extracción convencional”.

Por otra parte, al utilizar el 90% de amplitud ultrasónica, los valores de viscosidad de los polisacáridos extraídos son inferiores a la viscosidad del polisacárido obtenido por extracción convencional (Figura 24). Las curvas de viscosidad de esos extractos se ajustaron satisfactoriamente al modelo de Cross ($R^2 > 0.998$). Se observa un comportamiento newtoniano a bajos valores de cizalla, caracterizado

por el valor de η_0 (viscosidad newtoniana a bajos valores de cizalla), seguido por un comportamiento pseudoplástico; el recíproco de $\dot{\gamma}$ en donde ocurre la transición de comportamiento newtoniano a pseudoplástico, es el tiempo característico o la constante de tiempo del Modelo de Cross (i.e. λ). En las curvas de viscosidad de la Figura 24 no se observó la meseta newtoniana a valores altos de cizalla, por lo que no se determinó el valor de η_∞ . Se ha documentado (Rao, 2007) que a concentraciones suficientemente altas de polímeros, se presentan tres regiones en las curvas de viscosidad; es decir, la zona newtoniana a baja cizalla, región pseudoplástica, caracterizada por el valor de m , el cual cuando η_∞ presenta valores bajos (como en el presente trabajo), tiende al valor de n , el índice de flujo del Modelo de Ostwald-de Waele. Estas regiones en la curva de viscosidad se atribuyen a los arreglos conformacionales de las moléculas de biopolímero en la disolución como consecuencia del cizallamiento imperante. En la primera zona, cuando la magnitud del cizallamiento es baja, hay pocos re-arreglos de las cadenas poliméricas, mientras que al incrementar el gradiente de velocidad cortante se presentan re-arreglos graduales de las cadenas poliméricas generando una reo-fluidificación (Rao, 2007; Lapasin & Prici, 1995).

La Figura 24 y el Cuadro 13 muestran que los polisacáridos extraídos con 5 y 10 min de ultrasonificación con 90% de amplitud, presentan comportamientos similares al flujo, no hay diferencia en los valores de η_0 (0.866 Pa s y 0.906 Pa s, respectivamente) y el índice de flujo no parece afectarse por el tiempo de aplicación de ultrasonido ($m \approx 0.27$). Al aumentar el tiempo de aplicación de ultrasonido hasta 15 min, el valor de η_0 disminuye a 0.37, lo cual concuerda con el comportamiento presentado en la extracción asistida con ultrasonido con 30% de amplitud; en donde la viscosidad de las soluciones de las pectinas disminuyó al aumentar el tiempo de extracción. Los valores de λ disminuyeron al aumentar el tiempo de proceso con ultrasonido; esto indica que el inicio de la zona pseudoplástica sucede a velocidades de cizalla mayores en polisacáridos con mayores tiempos de exposición a ultrasonido durante su extracción. Por otra parte,

el uso de ultrasonido con 90% de amplitud ultrasónica durante 30 min generó un polisacárido cuyo comportamiento al flujo no se ajustó al modelo de Cross, su comportamiento reológico se ajustó mejor al Modelo de Ostwald-de Waele y presentó los valores más bajos de viscosidad con un ligero comportamiento pseudoplástico ($n=0.82$).

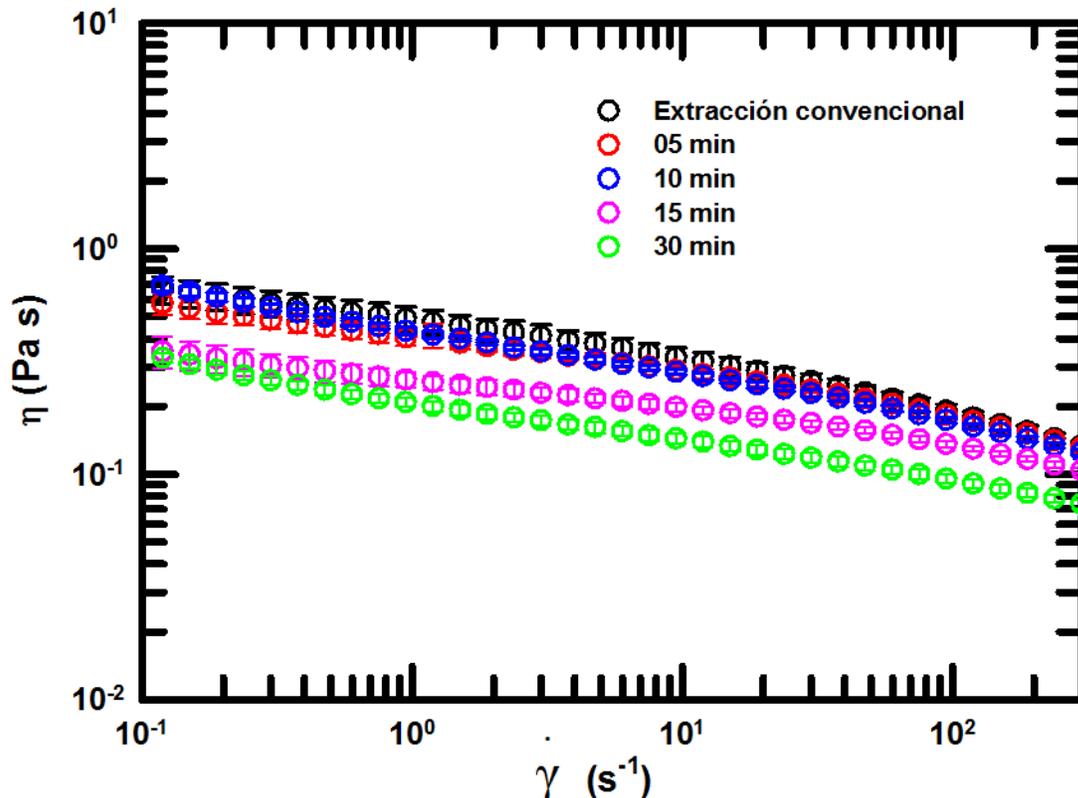


Figura 24. Curvas de viscosidad de pectinas de cáscara de tuna al 2% p/p y 25 °C. Extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad, 90% de amplitud a 60 °C. Se muestran los resultados para diferentes tiempos de ultrasonificación y la extracción en tanque agitado a 60 °C, 2 h sin ultrasonido, “extracción convencional”.

El comportamiento reológico de disoluciones de pectina depende de diversos parámetros estructurales dentro de los cuales se destacan el peso molecular, la cantidad y distribución de grupos metoxilo y acetilo, y el grado de ramificación de la pectina (Hwang & Kokini, 1992; Rolin 2002; Sengkhamparn, Sagis, de Vries, Schols, Sajjaanantakul & Voragen, 2010).

Estos aspectos estructurales son esenciales para inducir entrecruzamientos físicos intermoleculares, los cuales están fuertemente afectados por el pH, fuerza iónica y temperatura del medio. En polisacáridos tan complejos como las pectinas, es difícil establecer una relación entre las propiedades macromoleculares con las propiedades de flujo. Sin embargo, es posible asumir que los comportamientos al flujo observados en la Figura 24 sean el resultado del descenso en el peso molecular de los polisacáridos extraídos al usar una amplitud ultrasónica del 90% (ver Cuadro 10, pesos moleculares). Aún con la depolimerización generada por el ultrasonido, las pectinas extraídas en este trabajo presentan valores muy altos de pesos moleculares y posiblemente estructuras ramificadas (“zonas pilosas”) de cadenas de azúcares neutros (ver Cuadro 11), que pueden favorecer interacciones intermoleculares en solución, dando lugar a las viscosidades altas observadas a cizalla baja (η_0).

En la Figura 25 se comparan las curvas de viscosidad de algunas disoluciones acuosas de pectina de cáscara de tuna con pectina cítrica comercial (PC) (GENU® pectin type LM-12 CG, CP Kelco; DE = 36.6%) a la misma concentración. PC mostró un comportamiento ligeramente pseudoplástico ($n=0.92$) con $K = 0.0523 \text{ Pa s}^{0.92}$. Los valores de viscosidad aparente fueron inferiores de 2.5 a 7 veces (datos a $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$), comparadas con las pectinas de tuna extraídas a 60 °C por 30 min, 90% AU y 5 min 30% AU, respectivamente. Esta diferencia se debe principalmente al peso molecular, PC tiene un peso molecular promedio cercano a 76 kDa (Smistad, Boyum, Alund, Samuelsen & Hiorth, 2012), el cual es sustancialmente inferior a los pesos moleculares de los polisacáridos extraídos a partir de cáscara de tuna.

El comportamiento al flujo de las pectinas de cáscara de tuna, extraídas con asistencia de ultrasonido de alta intensidad, es similar al reportado por Seshadri et al. (2003), quienes estudiaron el efecto del ultrasonido de alta intensidad (0 a 40

$W \text{ cm}^{-2}$) en pectinas de alto grado de esterificación, con tiempos de 0 a 60 min. Los resultados de las curvas de flujo fueron ajustados al modelo Ostwald-de Waele, observando que a medida que se incrementaba la potencia ultrasónica y el tiempo de ultrasonificación disminuía el índice de consistencia (1.93 a 0.09 Pa s^n) e incrementaba el índice de flujo (0.6 - 0.97), lo que indicaba un cambio en el comportamiento al flujo, de pseudoplástico a newtoniano. Estos resultados fueron atribuidos a la disminución del peso molecular de las pectinas por acción del fenómeno de cavitación provocado por el ultrasonido de alta intensidad. Otros estudios (Zhang, 2013a) realizados en soluciones de pectina de manzana tratada con ultrasonido de alta intensidad con amplitudes del 20 al 60%, a 25°C y durante 60 min, mostraron una disminución considerable del peso molecular y una disminución hasta en tres órdenes de magnitud con respecto a la viscosidad de las disoluciones de pectina de manzana sin tratar con ultrasonido.

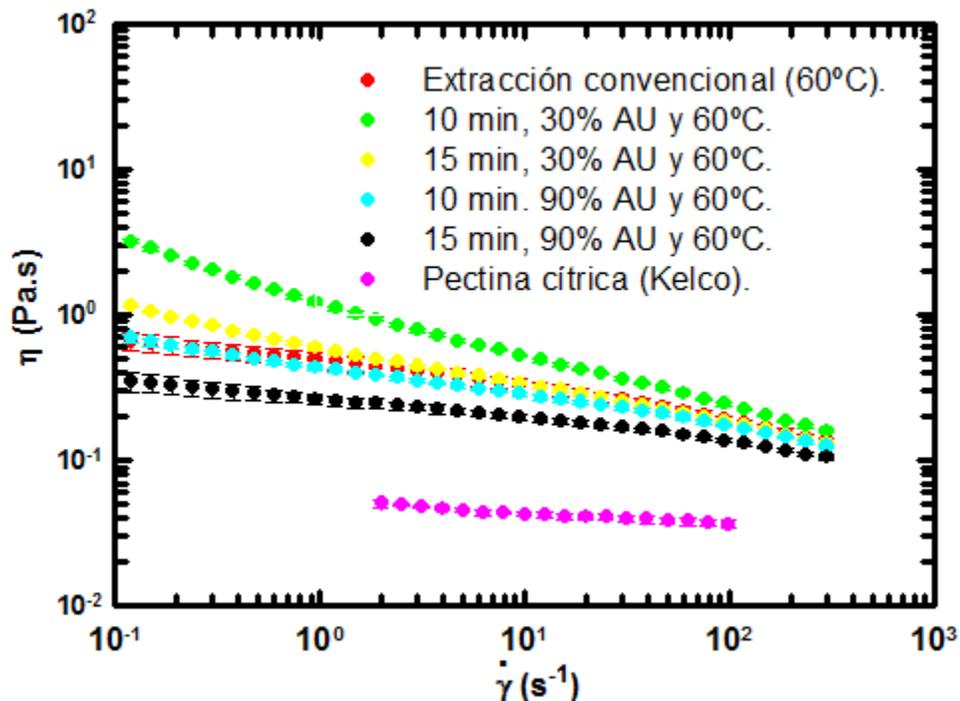


Figura 25. Valores de viscosidad de disoluciones de pectinas de cáscara de tuna extraídas por ultrasonido de alta intensidad al 2% p/p a diferentes tiempos y % AU. Se presentan también los valores de viscosidad de pectina cítrica comercial (PC) (GENU® pectin type LM-12 CG, CP Kelco; DE= 36.6% al 2% p/p. Todas la determinaciones se realizaron a 25°C .

Cuadro 13. Propiedades reológicas en flujo cortante simple de soluciones acuosas de pectina de cáscara de tuna al 2% p/p. Parámetros reológicos de los mejores ajustes de los datos a los modelos de Cross y Ostwald-de Waele. Determinaciones realizadas a 25 °C. Polisacáridos pécticos extraídos a 60 °C. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

Muestra	Modelo de Cross			Modelo Ostwald-de Waele		r^2	EE del valor estimado
	η_0 (Pa s)	λ (s)	m (-)	K (Pa s ⁿ)	n (-)		
Extracción convencional	0.782 \pm 0.127	0.301 \pm 0.120	0.34 \pm 0.01	---	---	0.999	0.003
30% AMPLITUD ULTRASÓNICA	P053060	---	---	1.765 \pm 0.121	0.58 \pm 0.01	0.999	0.020
	P103060	---	---	1.163 \pm 0.030	0.65 \pm 0.01	0.999	0.013
	P153060	---	---	0.599 \pm 0.013	0.74 \pm 0.02	0.998	0.014
	P303060	---	---	0.845 \pm 0.026	0.65 \pm 0.01	0.999	0.064
90% AMPLITUD ULTRASÓNICA	P059060	0.866 \pm 0.058	1.681 \pm 0.859	0.26 \pm 0.02	---	0.998	0.007
	P109060	0.906 \pm 0.067	1.328 \pm 0.121	0.29 \pm 0.00	---	0.999	0.004
	P159060	0.373 \pm 0.046	0.083 \pm 0.053	0.30 \pm 0.02	---	0.999	0.002
	P309060	---	---	---	0.213 \pm 0.104	0.82 \pm 0.00	0.998

η_0 : Viscosidad newtoniana a baja cizalla, λ : constante de tiempo del modelo de Cross, m: exponente adimensional del modelo de Cross, K: índice de consistencia, n: índice de flujo, r^2 = cuadrado del coeficiente de correlación y EE: Error estándar.

8.4.2 Pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud

Para la realización de las pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud se usó una concentración de pectina al 1% p/p de los polisacáridos extraídos por ultrasonido de alta intensidad (30 y 90% AU) y la pectina extraída por tanque agitado (extracción convencional). Para la gelificación de las muestras se usó una pantalla de NaCl_2 al 0.1 mM y 3 mM de CaCl_2 como contra-ión. El objetivo de usar una pantalla con NaCl_2 , fue disminuir la carga neta del polímero y permitir un mejor control del proceso de gelificación con CaCl_2 (Gigli et al., 2009).

En la Figuras 26 y 27 se muestra la evolución de los módulos dinámicos G' y G'' , así como tangente de delta en función de la temperatura de 70 a 25 °C, usando una frecuencia de oscilación 1 Hz con un esfuerzo constante de 0.2358 Pa, el cual generó deformaciones de 40% a 70 °C y deformaciones menores a 1% para los sistemas gelificados a 25 °C. Los barridos de temperatura mostraron un incremento continuo de los módulos dinámicos a medida que disminuyó la temperatura, principalmente entre 55 y 25 °C. En algunos casos, a 70 °C se observó un ligero predominio de G' sobre G'' , denotando un carácter elástico de la muestra al inicio del enfriamiento, por lo tanto con estas condiciones experimentales no es posible inferir el inicio de la transición sol-gel. Algunos autores han usado los barridos de temperatura de los módulos dinámicos, a una sola frecuencia, para estimar el intervalo de temperatura en donde ocurre la transición sol-gel de algunos biopolímeros como gelatina, β -lactoalbúminas, maltodextrinas y carrageninas. La identificación de esta temperatura se fundamenta en observar el punto donde se presenta el cruce de los módulos dinámicos, $G'=G''$, seguido de un incremento considerable de G' . Sin embargo, la determinación de esta transición se debe realizar usando distintas frecuencias de oscilación, debido a que el punto de gel es una propiedad intrínseca del material y

no puede ser dependiente de la frecuencia en los experimentos dinámicos (Lopes da Silva y Rao, 2007).

El incremento paulatino de G' y G'' durante el enfriamiento de las disoluciones de pectina y en presencia de CaCl_2 , se atribuye a la alta afinidad por los iones calcio de las cadenas de homogalacturano presentes en la pectina de tuna y coincide con lo observado en otras pectinas de bajo metoxilo (Cárdenas, Goycoolea & Rinaudo, 2008; Gigli et al., 2009). Es importante mencionar que cuando el inicio de la prueba se realizaba con mayor velocidad (colocación de la muestra e inicio del experimento), no se observó $G' > G''$ a temperaturas mayores a $60\text{ }^\circ\text{C}$, incluso en algunas muestras se logró observar el cruce de G' y G'' al disminuir la temperatura; por lo que el tiempo juega un papel crucial si se desea determinar la temperatura de transición sol-gel de estas pectinas. La alta reactividad al calcio de las pectinas extraídas de la cáscara de tuna, variedad *Opuntia albicarpa* S., ha sido evidenciada con anterioridad por Lira-Ortiz et al. (2014), en ese trabajo no se utilizó una pantalla de NaCl y se usaron concentraciones bajas de CaCl_2 y pectina para controlar la gelificación durante las pruebas reológicas.

La evolución de los módulos dinámicos con el tiempo en la muestra de pectina extraída por el método convencional, fue más reproducible, existió poca diferencia entre la prueba y su réplica, y el proceso de gelificación fue menos repentino o la muestra fue menos reactiva al calcio; se observó $G'' > G'$ al inicio del enfriamiento y un cruce de los módulos a temperaturas cercanas a $50\text{ }^\circ\text{C}$, seguido de un crecimiento gradual de ambos módulos con predominio de G' . Esta diferencia en el comportamiento pudiera deberse al número de unidades de ácido galacturónico que conforman el homogalacturano de la parte lisa de esta pectina; para esta muestra el contenido de ácido galacturónico fue 460.9 mg/g de pectina, el cual fue uno de los más bajos presentados por todos los tratamientos estudiados.

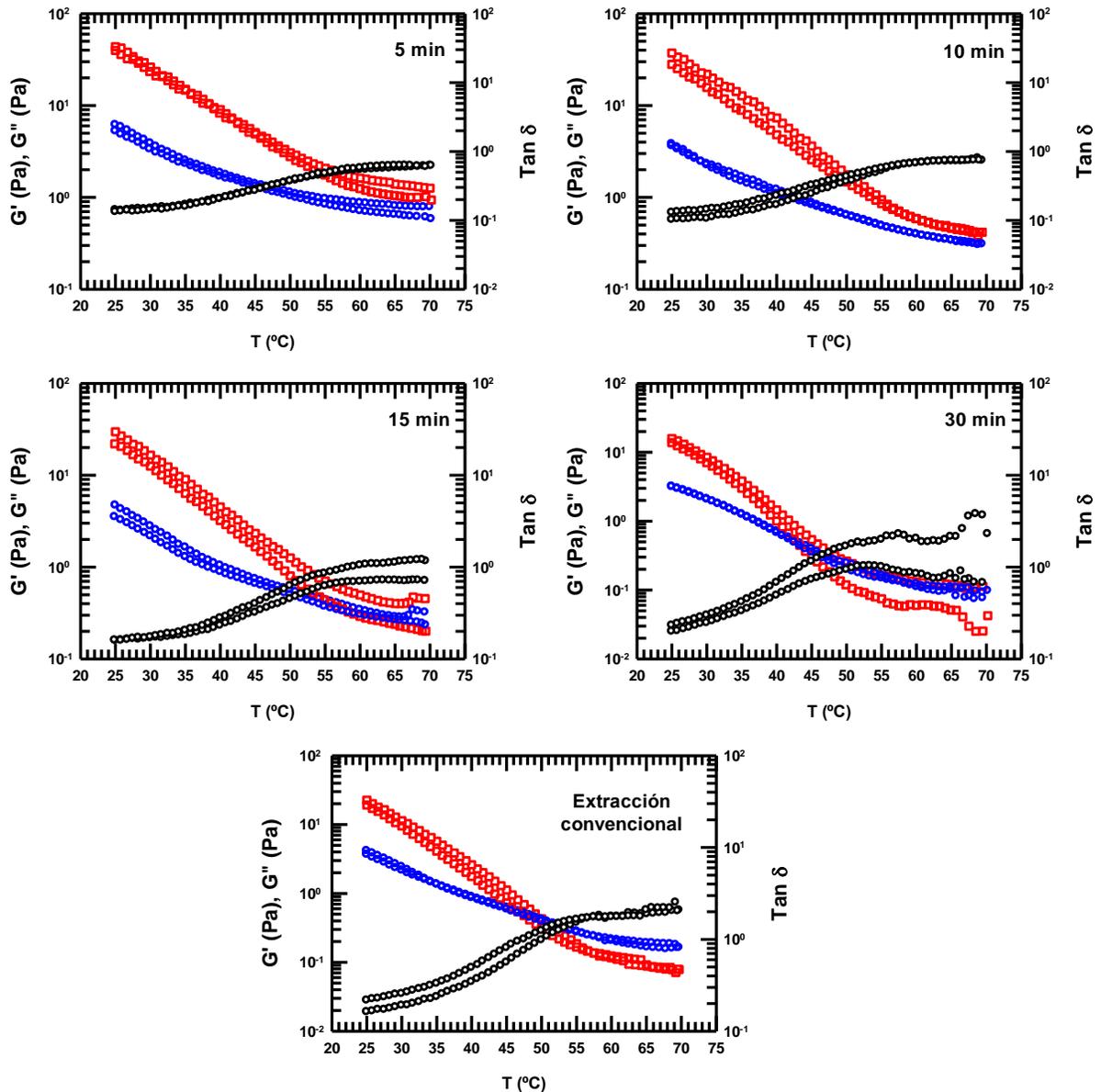


Figura 26. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) durante el enfriamiento de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas por ultrasonido de alta intensidad usando **30% AU**, 60 °C y diferentes tiempos de extracción. Para la gelificación de las soluciones se usó una pantalla de NaCl 0.1 N y 3 mM CaCl_2 . Determinaciones realizadas por duplicado a $\omega = 6.284$ rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 5 ± 0.2 °C/min; símbolos **rojos**= G' , símbolos **azules**= G'' y símbolos **negros**= $\tan \delta$.

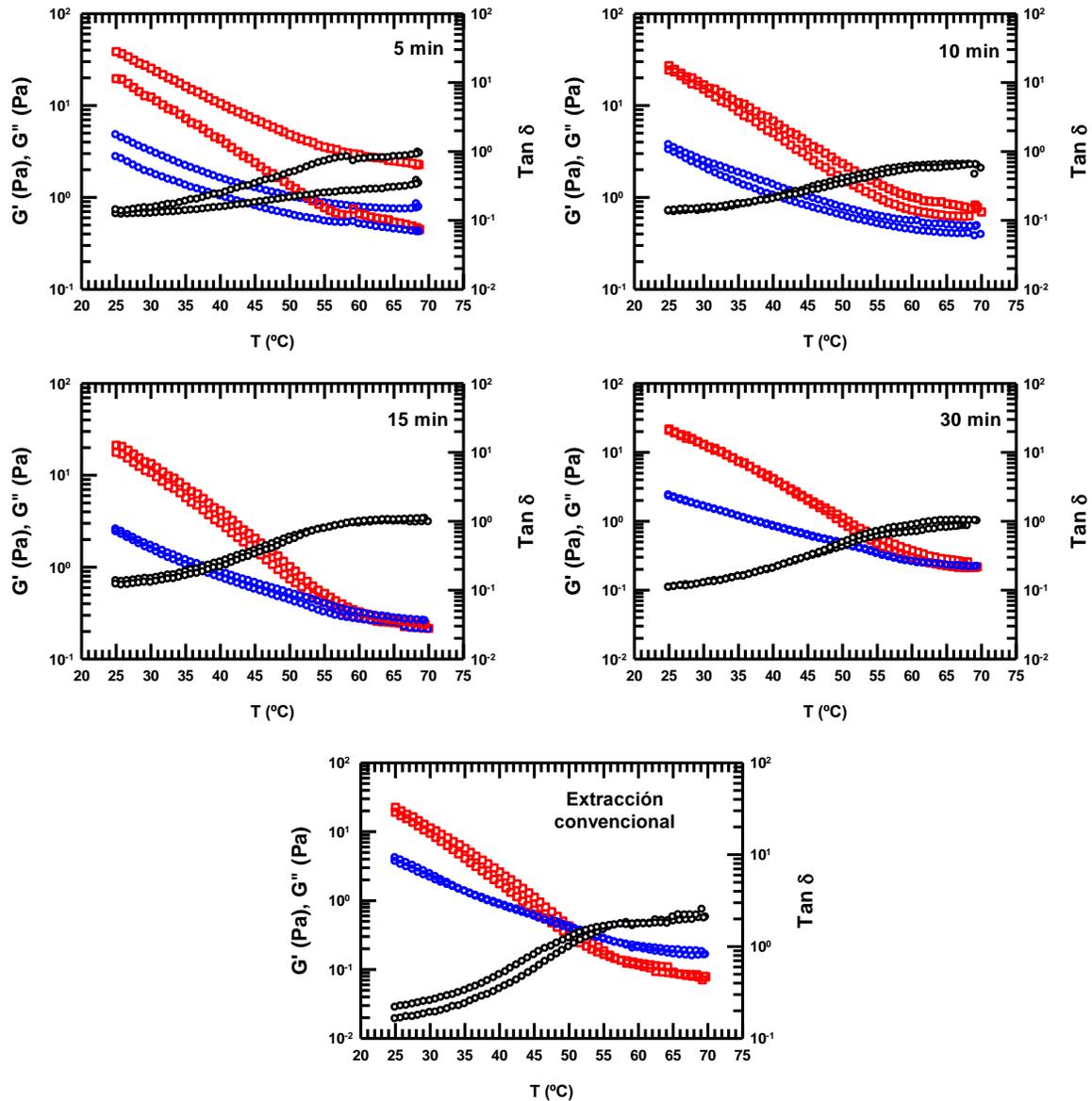


Figura 27. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) durante el enfriamiento de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas por ultrasonido de alta intensidad usando **90% AU**, 60 °C y diferentes tiempos de extracción. Para la gelificación de las soluciones se usó una pantalla de NaCl 0.1 N y 3 mM CaCl_2 . Determinaciones realizadas por duplicado a $\omega = 6.284$ rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 5 ± 0.2 °C/min; símbolos **rojos**= G' , símbolos **azules**= G'' y símbolos **negros**= $\tan \delta$.

En las Figuras 28 y 29 se muestra la evolución de los módulos dinámicos y $\tan \delta$ de las pectinas de tuna, en función del tiempo. El objetivo de esta prueba fue asegurar el estado estacionario de los módulos previo a la determinación del barrido de frecuencia. El criterio tomado para este estudio consistió en que la variación de los módulos dinámicos fuera menor a 0.1 Pa/min para considerar que G' y G'' estaban estacionarios. Para la mayoría de los sistemas estudiados, el tiempo máximo en el cual se observaba este comportamiento fue de 150 min. En todas las muestras fue evidente la dependencia de los módulos con el tiempo en los primeros 40 min a 25 °C. Por lo tanto la concentración de CaCl_2 usada para la gelificación de estas pectinas fue suficiente para estructurar al sistema como un gel fuerte. Se ha reportado que en presencia de NaCl, las pectinas de bajo metoxilo requieren menos cantidad de calcio para formar zonas de unión debido a que disminuyen las fuerzas repulsivas entre cadenas (Gigli et al., 2009).

En las Figuras 30 y 31, se muestran los barridos de frecuencia dentro de la zona de viscoelasticidad lineal (ver Anexo A), de los geles obtenidos a 1% p/p de las pectinas extraídas con ultrasonido de alta intensidad (90 y 30% de AU) y la extracción convencional. En todos los casos se puede distinguir un comportamiento de gel verdadero. Este comportamiento está definido por la presencia de $G' \gg G''$, G' con poca o nula dependencia con la frecuencia y valores de $\tan \delta$ inferiores a 0.1. La hipótesis general para estos materiales, es que la red tridimensional es capaz de ser “autosostenible”, originando que la gravedad no sea un factor importante para que el gel se deforme gravemente (Doublrier y Cuvelier, 1996). Por otra parte, se observa un ligero aumento del módulo de pérdida (G'') al aumentar la frecuencia. Este comportamiento sugiere que existen dos regiones de zonas de unión con diferentes tiempos de relajación, el proceso de relajación más corto correspondería a movimientos de las unidades de ácido galacturónico dentro de las zonas de unión (ajustes de la configuración local),

mientras que los procesos más largos estarían asociados al movimiento global de las zonas de unión (re-arreglos entre asociaciones cadena-cadena a través de entrecruzamientos o formación de enredos, “entanglements”) (Gigli et al., 2009).

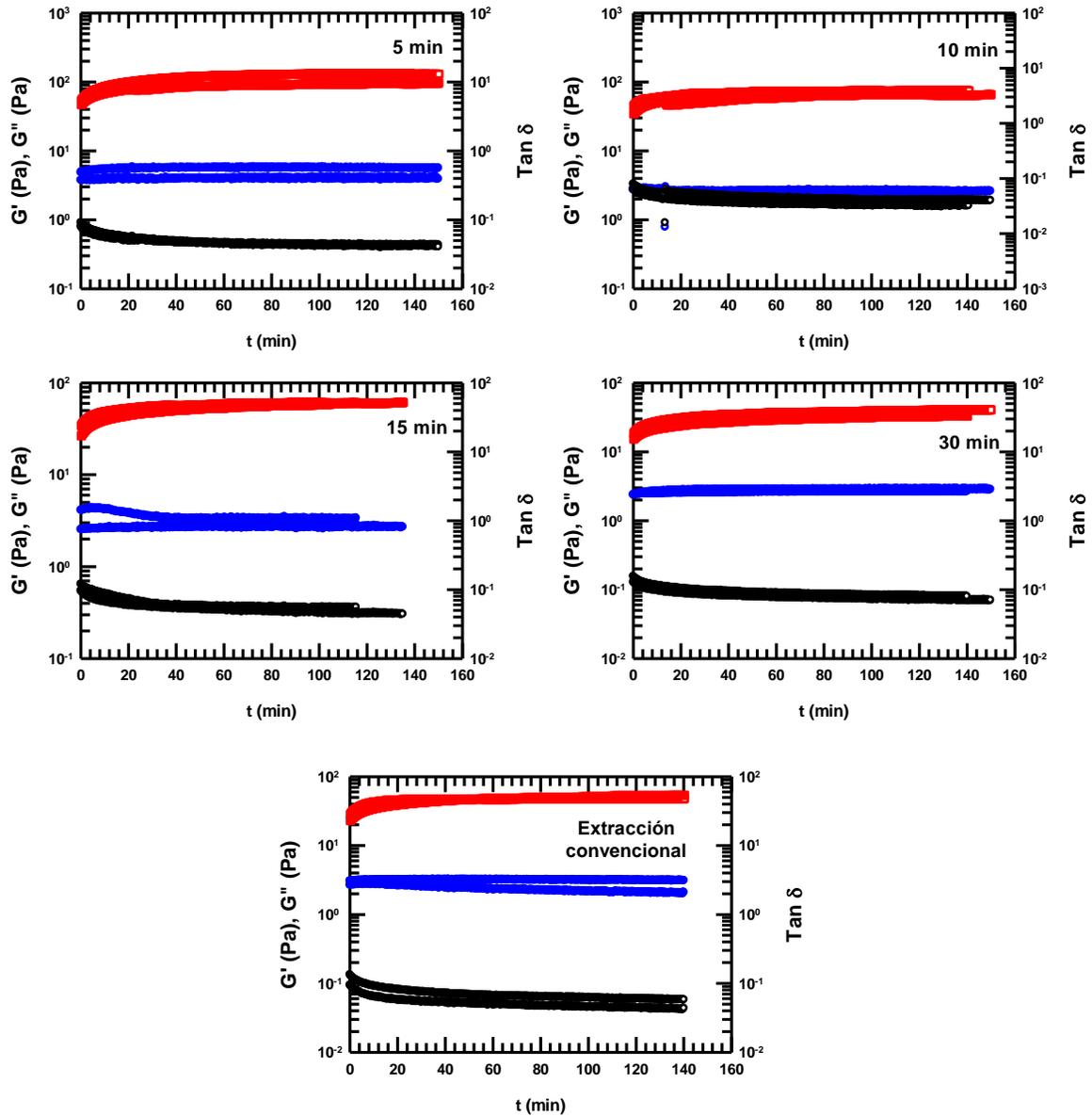


Figura 28. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) en función del tiempo de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas con la asistencia de ultrasonido de alta intensidad usando **30% AU**, 60 °C y diferentes tiempos de extracción. Para la gelificación de las soluciones se usó una pantalla de NaCl 0.1 N y 3 mM CaCl₂. Determinaciones realizadas por duplicado a $\omega = 1$ rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal; símbolos **rojos**= G' , símbolos **azules**= G'' y símbolos **negros**= $\tan \delta$.

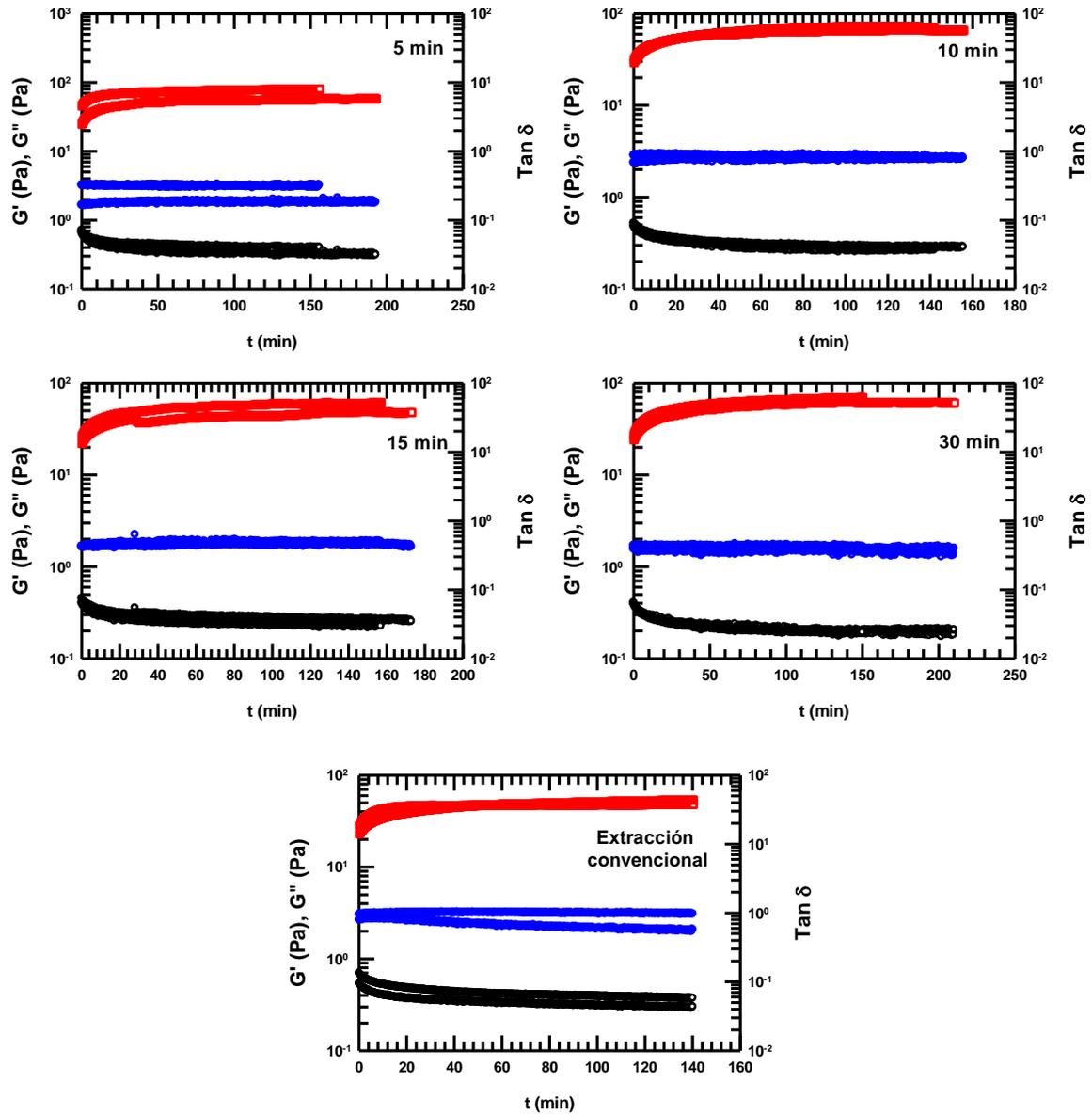


Figura 29. Evolución de los módulos dinámicos, G' y G'' , y tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) en función del tiempo de soluciones de pectina al 1% p/p, extraídas con la asistencia de ultrasonido de alta intensidad usando **90% AU**, 60 °C y usando diferentes tiempos de extracción. Para la gelificación de las soluciones se usó una pantalla de NaCl 0.1 N y 3 mM CaCl_2 . Determinaciones realizadas duplicado a $\omega = 1$ rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal; símbolos **rojos**= G' , símbolos **azules**= G'' y símbolos **negros**= $\tan \delta$.

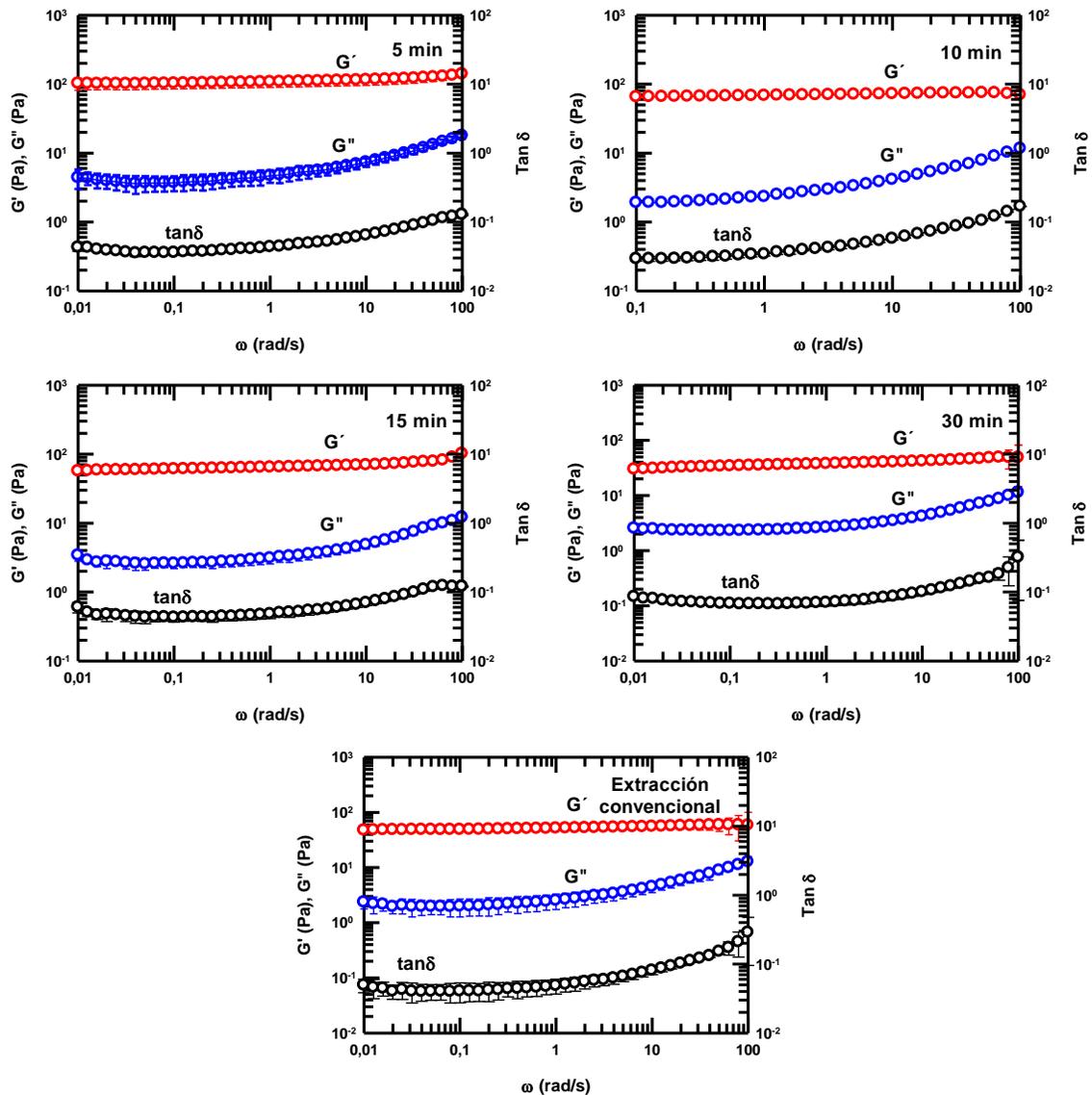


Figura 30. Espectros mecánicos de pectina de tuna en solución (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (30% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C. Para la gelificación se usó una pantalla de NaCl₂ 0.1 N y 3 mM de CaCl₂. Determinaciones realizadas por duplicado dentro de la zona de viscoelasticidad lineal ($\gamma = 0.1$ a 4 %) a 25 °C. Símbolos rojos= G' , símbolos azules= G'' y símbolos negros= $\tan \delta$.

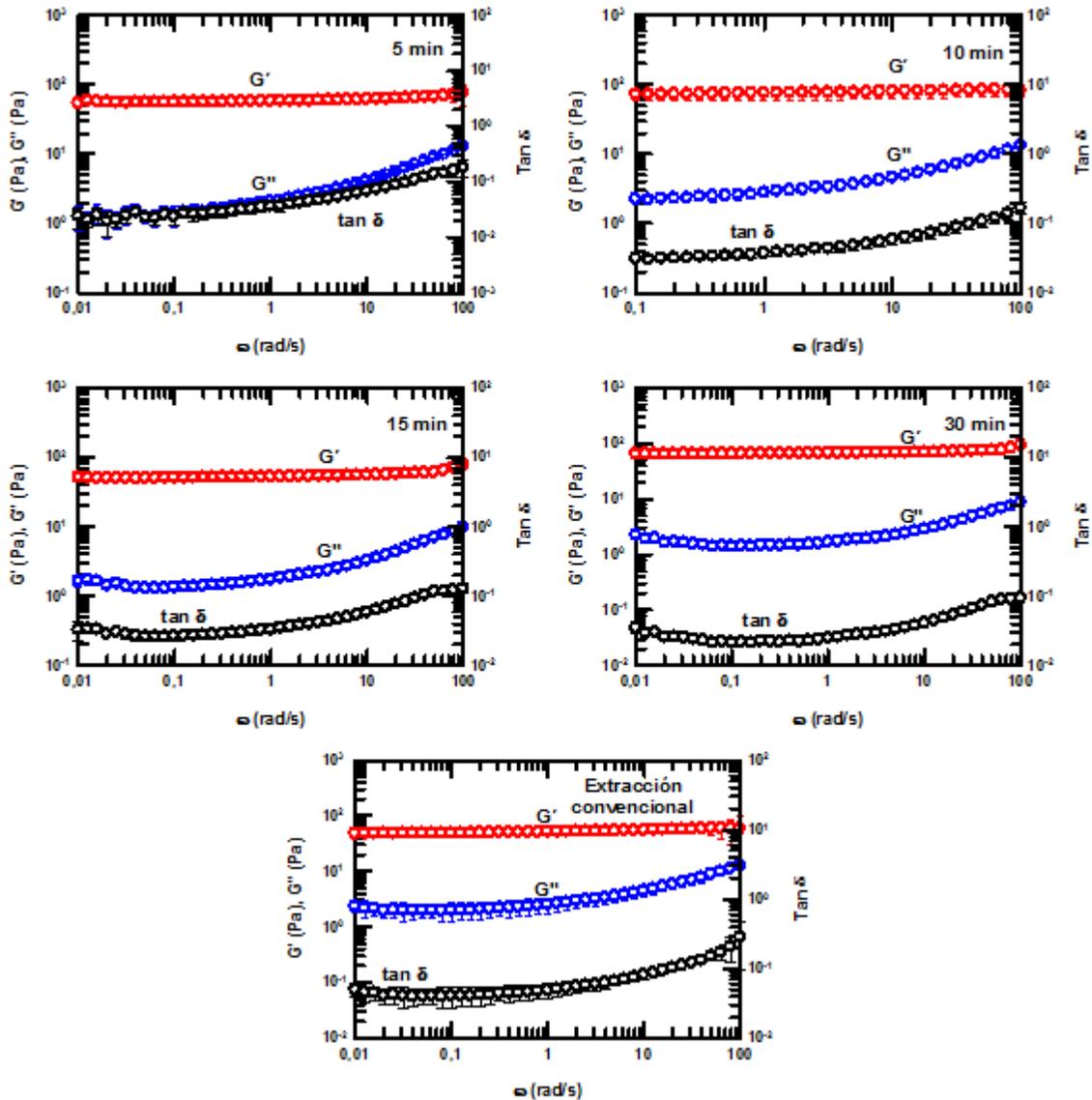


Figura 31. Espectros mecánicos de pectina de tuna en solución (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (90% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C. Para la gelificación se usó una pantalla de NaCl_2 0.1 N y 3 mM de CaCl_2 . Determinaciones realizadas por duplicado dentro de la zona de viscoelasticidad lineal ($\gamma = 0.1$ a 4%) a 25 °C. Símbolos rojos= G' , símbolos azules= G'' y símbolos negros= $\tan \delta$.

En la Figura 32 se presentan los valores de tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) en función de la frecuencia para las pectinas extraídas con 30% y 90% AU a 60 °C. De forma general se observa que $\tan \delta$ incrementa con la frecuencia, siguiendo el mismo patrón que G'' en las Figuras 30 y 31. Esto se atribuye a distintos tiempos de relajación en las zonas de unión. Para las pectinas extraídas con 30% AU (Figura 32a), los valores de $\tan \delta$ fueron similares a los de la pectina extraída convencionalmente a excepción de la pectina en donde se usó 30 min de ultrasonificación, la cual presenta una disminución en sus propiedades sólidas viscoelásticas. Esta disminución en el carácter elástico, comparado con el resto de las pectinas extraídas bajo la misma amplitud ultrasónica, sólo es explicable por la presencia de grupos acetilo (17.8% mol) que pudieran estar interfiriendo en la asociación cadena-cadena. El resto de las muestras presentaron valores menores de acetilación (ver Cuadro 11).

Por otra parte, en la Figura 32b se observa que los valores de $\tan \delta$ de las pectinas extraídas con 90% AU fueron ligeramente menores a los correspondientes a la pectina obtenida por extracción convencional, en todos los casos, $\tan \delta < 0.1$, por lo que se puede inferir que se obtienen sistemas más estructurados con las pectinas extraídas con mayor intensidad ultrasónica. Este efecto se atribuye a las diferencias en los grados de metoxilación de las muestras, en los sistemas en donde se usó 90% AU, se obtuvieron pectinas con los valores más bajos de grupos metoxilo (i.e. 2 a 11% mol; ver Cuadro 11), este bajo porcentaje de metoxilación de los ácidos galacturónicos presentes en las pectinas, genera mayor reactividad con el calcio presente como contra-ión, promoviendo la formación de más entrecruzamientos de tipo iónico en la red del polisacárido.

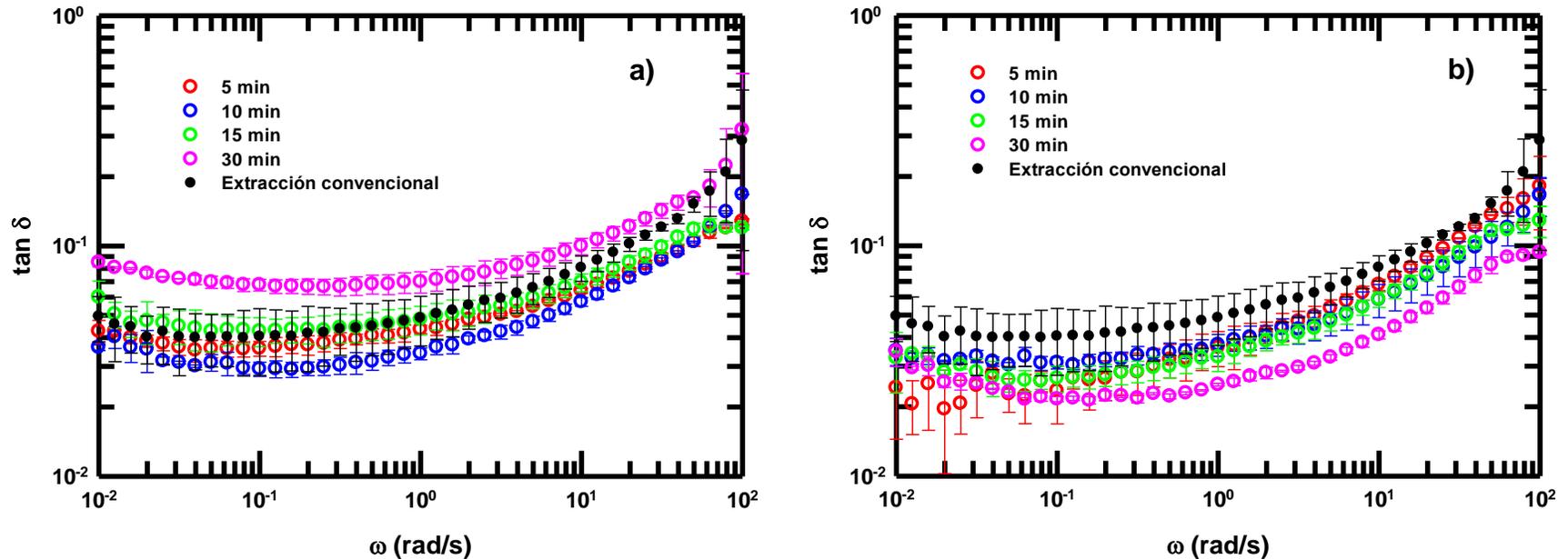


Figura 32. Tangente de delta ($\tan \delta = G''/G'$) en función de la frecuencia de disoluciones de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p. Se muestran los valores promedio de las pectinas extraídas con ultrasonido de alta intensidad a diferentes tiempos y a 60 °C y la obtenida por la extracción convencional a 60 °C: **a) 30% AU** y **b) 90% AU**. Valores obtenidos de los barridos de frecuencia (Figuras 30 y 31).

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de rendimiento y productividad obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- A temperaturas de extracción de 60 °C, se obtienen mayores rendimientos y productividades que a 40 °C. Esto se debe a que la temperatura juega un papel crucial en los procesos de difusión de los compuestos de la matriz interna de cáscara hacia el medio de extracción.
- A 60 °C, las condiciones que presentaron los mismos rendimientos que la extracción convencional fueron: 15 y 10 min de ultrasonicación a 30% de amplitud (AU) y 10 min de ultrasonicación a 90% AU.
- Comparando las productividades de los tratamientos que generaron rendimientos de extracción iguales a la extracción convencional a 60 °C, se confirma que la extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad resulta en productividades de 8 a 13 veces mayores que la productividad de la extracción convencional, lo cual representaría una alternativa para disminuir el gasto energético del proceso.
- El valor de rendimiento más alto alcanzado en este trabajo fue la condición de 30 min, 90% AU y 60 °C (i.e. 90.53 g_{polisacárido}/kg_{sólidos cáscara}), que mostró diferencias significativas con los restantes tratamientos estudiados.

De acuerdo con los resultados de los análisis macromoleculares obtenidos se puede concluir que:

- Los análisis de FT-IR a los extractos crudos, confirmaron la presencia de polímeros tipo pectina, con impurezas que denotan la presencia de proteínas (cuantificada por el método Kjeldahl) y compuestos que contienen en su estructura anillos aromáticos. Después de realizar un proceso de clarificación en los extractos crudos, se logró obtener pectinas con mayor pureza.
- Los resultados de peso molecular revelan que las pectinas extraídas con asistencia de ultrasonido tienen pesos moleculares promedio cercanos a 1.8×10^6 Da con fracciones que oscilan en valores de pesos moleculares de 1.4×10^6 a 2.1×10^6 Da. El efecto de la extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad a tiempos de 5 a 30 min con 30% AU a temperaturas de 40 y 60 °C, no generó cambios en el peso molecular. Por otra parte, las pectinas extraídas a tiempos de 5 a 30 min con 90% AU y 60 °C, presentaron una disminución del peso molecular promedio de las pectinas a medida que aumentó el tiempo de proceso, es decir, se presentó una depolimerización debido a que las condiciones de extracción con ultrasonido generó una alta cantidad de burbujas de cavitación en los medios viscosos de extracción.
- La determinación de ácido galacturónico a la pectinas extraídas con asistencia de ultrasonido de alta intensidad, mostraron que el contenido de éste aumenta con el tiempo de extracción con ultrasonido, esto muestra un efecto positivo en el uso de ultrasonido en la extracción de pectinas de cáscara de tuna, debido a que el Codex Alimentario exigen mayores contenidos en ácido galacturónico para aceptar como “pectina” a un polisacárido péctico.

- Los azúcares neutros en las pectinas de tuna de este trabajo fueron: glucosa, ramnosa y arabinosa, sin ser detectada galactosa y predominando en todos los tratamientos la ramnosa. La ausencia de galactosa puede ser resultado de la eliminación del residuo no soluble durante la etapa de purificación de las pectinas, debido a que es frecuente co-extraer arabinogalactano II (polisacárido péctico rico en galactosa) con proteína estructural, los cuales son difíciles de separar.
- La determinación del grado de metoxilación (GM) a las pectinas extraídas de cáscara de tuna, confirmaron la presencia de pectinas de bajo metoxilo (2 a 25 %mol). El valor de GM disminuyó con el tiempo de sonicación en ambos valores de AU.
- La presencia de grupos acetilo en estas pectinas puede ser de interés tecnológico, debido a que se ha demostrado que la presencia de estos grupos en pectinas de remolacha azucarera le confiere propiedades de superficie a la molécula.
- Las disoluciones acuosas de las pectinas extraídas presentaron un comportamiento no newtoniano que se ajustó los modelos de Ostwald-de Waele y de Cross. La viscosidad de las soluciones de pectina de tuna disminuyó a medida que aumentó el tiempo de proceso y la amplitud ultrasónica.
- Los geles formados por la pectina de tuna extraída con asistencia de ultrasonido y tanque agitado (extracción convencional) presentaron la formación de un gel fuerte en presencia de 3 mM CaCl₂. El ultrasonido no modificó las propiedades viscoelásticas de los geles, al menos con las condiciones de concentración de pectina y CaCl₂ evaluadas en este trabajo.

10. PERSPECTIVAS

La extracción asistida con ultrasonido de alta intensidad de pectinas de cáscara de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) generó rendimientos satisfactorios comparados con la extracción convencional, pero tomando en cuenta los cambios que puede realizar a las propiedades macromoleculares del polisacárido, se recomienda la utilización de valores bajos de porcentaje de amplitud o de intensidad a tiempos de proceso no mayores a 15 min. Las ventajas que se pueden obtener al seguir estos parámetros son evitar la depolimeración, uso innecesario de energía, reducir los tiempos de proceso, reducir la des-metoxilación de las pectinas y obtener soluciones de pectina con mayor viscosidad. Por otra parte, se recomienda evaluar otras concentraciones de EDTA (> 0.5%) para aumentar los valores de rendimiento de las pectinas de tuna.

El ultrasonido de alta intensidad puede ser usado para modificar las propiedades funcionales de las pectinas de tuna, evaluando distintos niveles de intensidad y tiempo en soluciones de pectina para obtener la depolimeración de estas macromoléculas, generando oligosacáridos de pectina, actualmente muy cotizados en la industria farmacéutica; así como pectinas de menor peso molecular que pudieran reemplazar a las pectinas cítricas.

11. REFERENCIAS

- Ahmed, J., Ramaswamy, H. S., Kasapis, S. & Boye, J. I. (2010). Introduction. En "Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties". Jasim Ahmed, Hosahalli S. Ramaswamy, Stefan Kasapis & Joyce I. Boye (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton Florida, United States of America. Pag: 1-6.
- Álava, J. M., Sahi, S. S., García-Álvarez, J., Turó, A., Chávez, J. A., García, M. J. & Salazar, J. (2007). Use of ultrasound for the determination of flour quality. *Ultrasonics*, 46, 270-76.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International (1995). 16th ed. Arlington, VA: AOAC International.
- ASERCA. (2011). Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. Nopal y tuna, una mirada a su realidad actual. *Claridades Agropecuarias*, 213, 5-14.
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A. & Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11-12), 1237-1243. doi: 10.1016/j.cep.2011.08.002.
- Baxter, S., Zivanovic, S. & Weiss, J. (2005). Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 821-830. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.11.002.
- Benedito, J., Carcel, J. A., González, R. & Mulet, A. (2002). Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. *Ultrasonics*, 40, 19-23.
- Benito-Román, Ó., Alonso, E. & Cocero, M. J. (2013). Ultrasound-assisted extraction of β -glucans from barley. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 57-63. doi: 10.1016/j.lwt.2012.07.006.
- Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T. & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultrasound applications in food processing. En "Ultrasound technologies for food and bioprocessing". Second Edition. Feng, H., Barbosa-Cánovas, G., V. & Weiss, J. Food (Eds). Editorial Springer. New York, USA. Pag: 65-90.
- Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C. & Wenjuan, D. (2006). Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 511-516.
- Cárdenas, A., Goycoolea, F. M. & Rinaudo, M. (2008). On the gelling behaviour of 'nopal' (*Opuntia ficus-indica*) low methoxyl pectin. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 212-222. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.11.017.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S. & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 975-983.

- Chemat, F., Zill E, H. & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- Chen, Y., Luo, H., Gao, A. & Zhu, M. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seed by response surface methodology and their structural characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 305-309. doi: 10.1016/j.ifset.2011.03.003.
- Cheung, Y.-C. & Wu, J.-Y. (2013). Kinetic models and process parameters for ultrasound-assisted extraction of water-soluble components and polysaccharides from a medicinal fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 214-220. doi: 10.1016/j.bej.2013.08.009.
- Chivate, M.M. & Pandit, A.B. (1995). Quantification of cavitation intensity in fluid bulk. *Ultrasonics Sonochemistry* 2:19-25.
- Coates John, (2000). Interpretation of spectra, a practical approach. En *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Meyers, R., A., (ed.), John Wiley y Sons Ltd, Chichester, 10815-10837.
- Czechowska-Biskup, R., Rokita, B., Lotfy, S., Ulanski, P. & Rosiak, J. M. (2005). Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 175-184. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.12.001.
- De Vries, J. A., den Uijl, C.H., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M. & Pilnik, W. (1983). Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 3, 193-205.
- Doublier, J.L. & Cuvelier, G. (1996). Gums and Hydrocolloids: Functional Aspects. En "Carbohydrates in Food", A.C. Eliasson (ed.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, pp 283-318.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A. & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120. doi: 10.1007/s12393-011-9036-6.
- Farahnaky, A., Bakhshizadeh-Shirazi, S., Mesbahi, G., Majzoobi, M., Rezvani, E. & Schleining, G. (2013). Ultrasound-assisted isolation of mucilaginous hydrocolloids from *Salvia macrosiphon* seeds and studying their functional properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 182-190. doi: 10.1016/j.ifset.2013.06.003.
- Forni, E., Penci, M. & Polesello, A. (1994). A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.) and prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) peel. *Carbohydrate Polymers*, 23, 213-234.
- Fraeye, I., Duvetter, T., Doungla, E., Van Loey, A. & Hendrickx, M. (2010). Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 21(5), 219-228. doi: 10.1016/j.tifs.2010.02.001.

- Gallegos-Vázquez, C., Cervantes-Herrera, J. & Barrientos-Priego A. F. (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 Chapingo (UACH). Chapingo, México.
- Garna, H., Mabon, N., Nott, K., Wathélet, B. & Paquot, M. (2006). Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry*, 96(3), 477-484. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.03.002.
- Gigli, J., Garnier, C. & Piazza, L. (2009). Rheological behaviour of low-methoxyl pectin gels over an extended frequency window. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1406-1412. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.09.015.
- Gogate, P. R. & Kabadi, A.M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering /biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60-72.
- Gould, G. W. (2001). New processing technologies: an overview. *Proceedings of the Nutritional Society*, 60, 463-74.
- Grönroos, A., Pentti, P. & Hanna, K. (2008). Ultrasonic degradation of aqueous carboxymethylcellulose: effect of viscosity, molecular mass, and concentration. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), 644-648. doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.09.005.
- Grönroos, A., Pirkonen, P., Heikkinen, J., Ihalainen, J., Mursunen, H. & Sekki, H. (2001). Ultrasonic depolymerization of aqueous polyvinyl alcohol. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 259-264.
- Habibi, Y., Heyraud, A., Mahrouz, M. & Vignon, M. R. (2004). Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 339(6), 1119-1127. doi: 10.1016/j.carres.2004.02.005.
- Habibi, Y., Mahrouz, M. & Vignon, M. R. (2005). Isolation and structural characterization of protopectin from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 205-213. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.01.001.
- Herrero, M.A. & Romero de Ávila, M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, Vol. 50, 71-74.
- Hromádková, Z. & Ebringerová, A. (2003). Ultrasonic extraction of plant materials— investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(3), 127-133. doi: 10.1016/S1350-4177(03)00094-4.
- Hromádková, Z., Ebringerová, A. & Valachovic, P. (2002). Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 9, 37-44.

- Hromadkova, Z., Kost'alova, Z. & Ebringerova, A. (2008). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6), 1062-1068. doi: 10.1016/j.ultsonch.2008.04.008.
- Hwang, J. & Kokini, J. L. (1992). Contribution of the side branches to rheological properties of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 19, 41-50.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N. & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195-203.
- Kanthale, p. M., Gogate, P.R., Pandit, A.B. & Wilhelm, A.M. (2003). Mapping of an ultrasonic horn: link primary and secondary effects of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6), 331-335.
- Kardos, N. & Luche, J.L. (2001). Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydrate Polymers*, 332, 115-131.
- Kelco (2013). CP Kelco Announces Pectin Capacity Expansion Plans. <http://www.cpkelco.com>. Último acceso 15 de marzo de 2013.
- Kelco (2014). CP Kelco Pectin. <http://www.cpkelco.com/products-pectin.html>. Último acceso 24 de enero de 2014.
- Košťálová, Z., Hromádková, Z. & Ebringerová, A. (2010). Isolation and characterization of pectic polysaccharides from the seeded fruit of oil pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca*). *Industrial crops and products*, 31(2), 370-377. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.12.007.
- Košťálová, Z., Hromádková, Z. & Ebringerová, A. (2013). Structural diversity of pectins isolated from the Styrian oil-pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) fruit. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 163-171. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.017.
- Kuijpers, M. W. A., Kemmere, M.F. & Keurentjes, J.T.F. (2002). Calorimetric study of the energy efficiency for ultrasound-induced radical formation. *Ultrasonics*, 40(1-8), 675-678.
- Lapasin, R. & Prich, S. (1995). *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. University of Trieste, Italy. Springer-Science+Business Media, B.V. Pag: 250-494.
- Li, H., Pordesimo, L. & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731-738.
- Lira-Ortiz, A. L. (2009). Estudio químico y reológico de polisacáridos tipo pectina de la cáscara de tuna (*Opuntia* spp.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

- Lira-Ortiz, A. L., Reséndiz-Vega, F., Ríos-Leal, E., Contreras-Esquivel, J. C., Chavarría-Hernández, N., Vargas-Torres, A. & Rodríguez-Hernández, A. I. (2014). Pectins from waste of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar 'Reyna'): Chemical and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 37, 93-99. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.018.
- Lopes Da Silva J.A. & Rao, M.A. (2007). Rheological Behavior of Food Gels. En "Rheology of Fluid and Semisolid Foods. Principles and Applications", Rao, M.A (ed.), 2nd edition. Springer, Nueva York, United States of America, pp 339-388.
- Lorimer, J. P., Mason, T.J., Cuthbert, T.C. & Brookfield, E.A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(1), S55-S57.
- Lozada-Carbajal, M. A. (2007), Extracción y caracterización reológica de polisacáridos tipo pectina de la cáscara de tuna (*Opuntia* spp.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
- Majdoub, H., Roudesli, S. & Deratani, A. (2001). Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behaviour. *Polymer International*, 50, 552-560.
- Margulis, M. A. & Margulis, I. M. (2003). Calorimetric method for measurement of acoustic power absorbed in a volume of a liquid. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6), 343-345. doi: 10.1016/S1350-4177(03)00100-7.
- Marry, M., McCann, M.C., Kolpak, F., White, A.R., Stacey, N. J. & Roberts, K. (2000). Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 17-28.
- Martin, C.J. & Law, A.N.R. (1983) Design of thermistor probes for measurement of ultrasound intensity distributions. *Ultrasonics* 21:85-90.
- McClements, D. J. 1997. Ultrasonic characterization of foods and drinks: Principles, methods, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 1-46.
- Milani, E., Koocheki, A. & Golimovahhed, Q. A. (2011). Extraction of inulin from Burdock root (*Arctium lappa*) using high intensity ultrasound. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(8), 1699-1704. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02673.x.
- Morrison y Boyd (1998). *Química Orgánica*, 5ta edición, Editorial Person Educación. México. Pag. 559-567.
- Ngouémazong, D. E., Kabuye, G., Fraeye, I., Cardinaels, R., Van Loey, A., Moldenaers, P. & Hendrickx, M. (2012a). Effect of debranching on the rheological properties of Ca²⁺ pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 44-53. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.04.009.

- Ngouémazong, D. E., Tengweh, F. F., Fraeye, I., Duvetter, T., Cardinaels, R., Van Loey, A., Moldenaers, P. & Hendrickx, M. (2012b). Effect of de-methylesterification on network development and nature of Ca²⁺-pectin gels: Towards understanding structure–function relations of pectin. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 89-98. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.04.002,.
- Panchev, I. N., Kirtchev, N.A. & Kratchanov, C.G. (1994). On the production of low esterified pectic raw materials with ultrasound treatment. *Food Hydrocolloids*, 8(1), 9-17.
- Patist, A. & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 147-154. doi: 10.1016/j.ifset.2007.07.004
- Piga, A. (2004). Cactus pear: A fruit of nutraceutical and functional importance. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 9, 9-22.
- Povey, M. J. W. (1989). Ultrasonics in Food Engineering. Part II: Applications. *Journal of Food Engineering*, 9, 1-20.
- Prakash Maran, J., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Vigna Nivetha, C. & Dinesh, R. (2013). Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 604-611. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.020.
- Prakash Maran, J., Mekala, V. & Manikandan, S. (2013). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 2018-2026. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.086.
- Rao, M. A. (2007). Flow and functional models for rheological properties of fluid foods. En “Rheology of fluid and semisolid foods”, M. A. Rao (Ed.), NewYork: Springer., pp. 27-58.
- Resa, P., Bolumar, T., Elvira, L., Pérez, G. & Montero de Espinosa, F. 2007. Monitoring lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. *Journal of Food Engineering*, 78, 1083-1091.
- Reséndiz-Vega, F. (2010). Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
- Roldán-Gutiérrez, J.M., Ruiz-Jiménez, J. & Luque de Castro, M.D. (2008). Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction, *Talanta* 75:1369-1375.
- Rolin, C. (2002). Commercial pectin preparations. En “Pectins and their manipulation”, G. B. Seymour & J. P. Knox (Eds.), Florida: Blackwell Publishing CRC., pp. 222-241.

- Salazar, J., Chávez, J. A., Turó, A. & García-Hernández, M. J. (2010). Effect of Ultrasound on Food Processing. En "Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties". Jasim Ahmed Hosahalli S. Ramaswamy, Stefan Kasapis & Joyce I. Boye (Ed.), Novel Boca. Raton Florida, United States of America: CRC Press, Taylor & Francis Group. (pp. 65-84).
- Seisun, D. (2002). Overview of the Hydrocolloid Market. En "Gums and Stabilisers for the Food Industry 11". Peter A. Williams & Glyn O, Phillips (Eds.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido; págs: 3-9.
- Sengkhampan, N., Sagis, L. M. C., de Vries, R. & Schols, H. A., Sajjaanantakul, T. & Voragen, A. G. J. (2010). Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Food Hydrocolloids*, 24(1), 35-41. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.07.007.
- Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G.J. & Mount, J. (2003). Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions. *Food Hydrocolloids*, 17, 191-197.
- SIAP. (2013). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Gobierno Federal. México. SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx>. (último acceso 20 Octubre 2013).
- Simal, S., Benedito, J., Clemente, G., Femenia, A. & Rosselló, C. (2003). Ultrasonic determination of the composition of a meat-based product. *Journal of Food Engineering*, 58, 253-57.
- Smistad, G., Boyum, S., Alund, S. J., Samuelsen, A. B. & Hiorth, M. (2012). The potential of pectin as a stabilizer for liposomal drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1337-1344. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.07.002.
- Soria, A. C. & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331. doi: 10.1016/j.tifs.2010.04.003.
- Suslick, K. S. (1989). The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, 2, 80-86.
- Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C. & Lo, Y. M. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 522-529. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.12.042.
- Veillet, S., Tomao, V. & Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), 905-911.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P. & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263-275. doi: 10.1007/s11224-009-9442-Z.

- Voragen, A. G. J., Schols, H.A. & Pilnik, W. (1986). Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by HPLC. *Food Hydrocolloids*, 1(1), 65-70.
- Wang, J., Sun, B., Liu, Y. & Zhang, H. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran. *Food Chemistry*, 150, 482-488. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.121.
- Weissler, A., Cooper, H.W. & Snyder, S. (1950). Chemical effects of ultrasonic waves: oxidation of potassium iodide solution by carbon tetrachloride. *Journal of the American Chemical Society*, 72: 1769-1775.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P. & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104. doi: 10.1016/j.tifs.2005.10.008
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X. & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72-81.
- Ying, Z, Han, X & Li, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry* 127, 1273-1279.
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y. & Liu, D. (2013a). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 222-231. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.021.
- Zhang, L., Ye, X., Xue, S. J., Zhang, X., Liu, D., Meng, R. & Chen, S. (2013b). Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties and nanostructure of citrus pectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), 2028-2036. doi: 10.1002/jsfa.6011.

12. ANEXOS

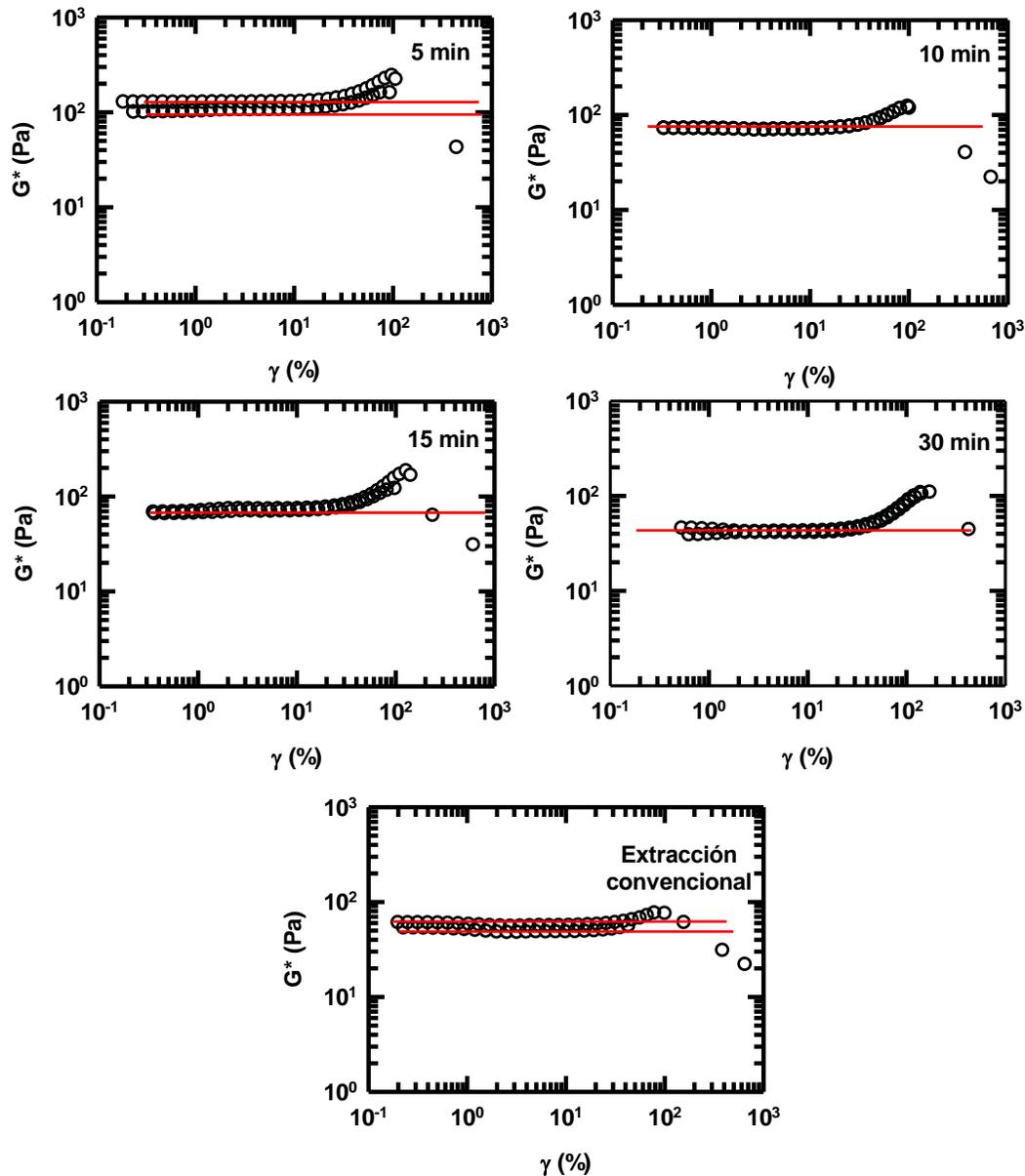


Figura A- 1. Zona de viscoelasticidad lineal de soluciones de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (30% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C. Para la gelificación se usó una pantalla de NaCl_2 al 0.1 mM y 3 mM de CaCl_2 . Determinaciones realizadas por duplicado a 25 °C y 6.284 rad/s.

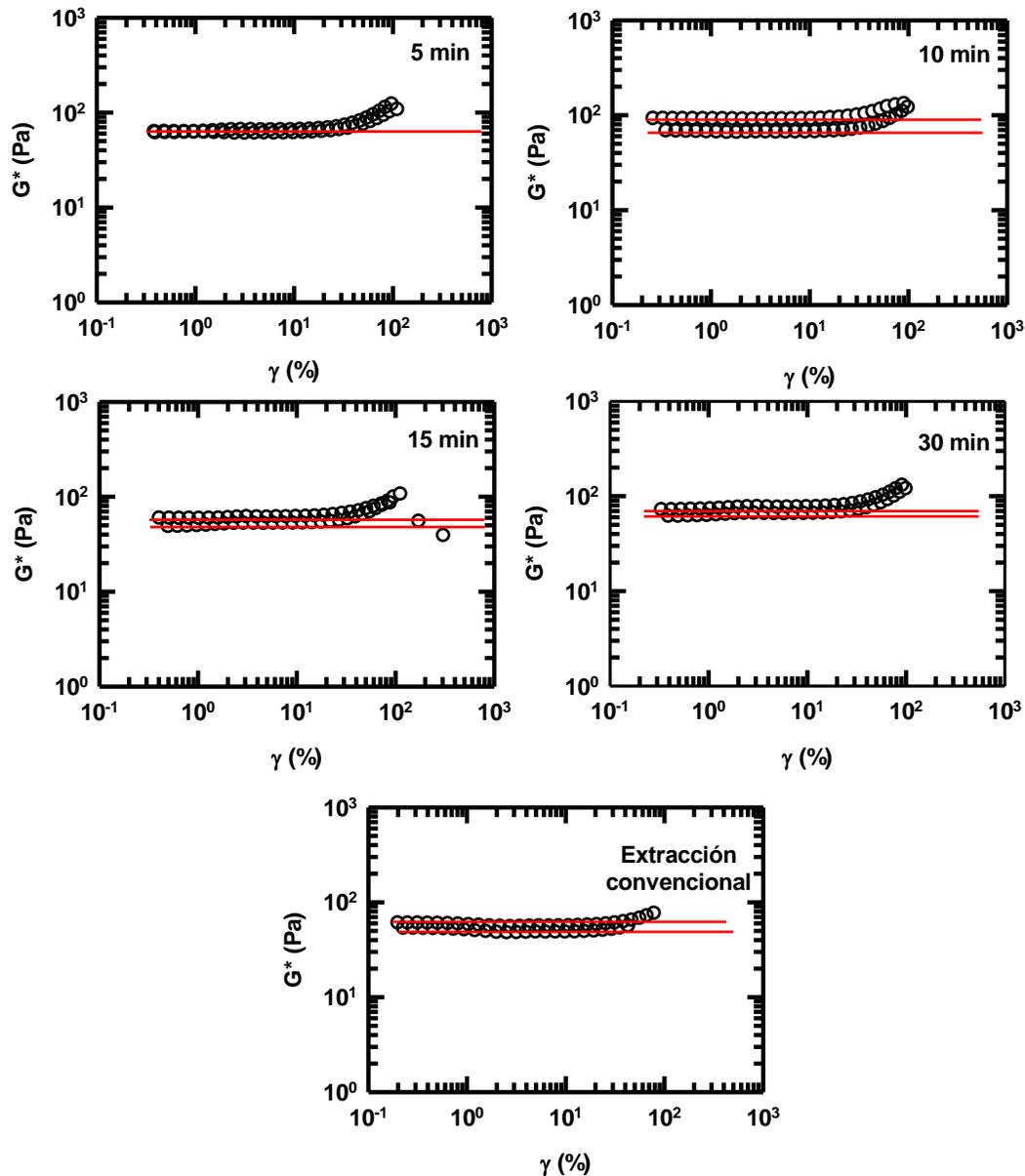


Figura A- 2. Zona de viscoelasticidad lineal de soluciones de pectina de tuna (*Opuntia albicarpa* S.) al 1% p/p, extraída con ultrasonido de alta intensidad (90% AU) a diferentes tiempos y 60 °C, comparada con pectina obtenida por extracción convencional a 60 °C. Para la gelificación se usó una pantalla de NaCl_2 al 0.1 mM y 3 mM de CaCl_2 . Determinaciones realizadas por duplicado a 25 °C y 6.284 rad/s.



National Congress of
**Biotechnology and
Bioengineering**



GIM2013
12th International Symposium on the
**GENETICS OF INDUSTRIAL
MICROORGANISMS**

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

We hereby certify that

Pérez Campos Sixto Josué

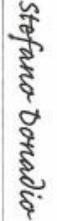
Attended the XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and
12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms,
June 23rd - 28th, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.


Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
President of SMIBB


Dr. Cristóbal Koé Aguilera González
President of the Organizing Committee
SMIBB


Dra. Romina Rodríguez Somoja
President of the Scientific
Committee SMIBB/GIM


Dr. Sergio Sánchez Esquivel
President of the Organizing
Committee GIM


Dr. Stefano Donadio
President of GIM



National Congress of
**Biotechnology and
Bioengineering**



GIM2013
12th International Symposium on the
**GENETICS OF INDUSTRIAL
MICROORGANISMS**

CERTIFICATE OF PRESENTATION

We hereby certify that

Sixto Josué Pérez Campos, Norberto Chavarría Hernández, Guillermo A. López Huape, Adriana I. Rodríguez Hernández

Delivered the Poster presentation

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PECTIN FROM PRICKLY PEAR PEEL (Opuntia albicarpa S.)

XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and
12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.
June 23rd - 28th, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.


Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
President of SMAB


Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
President of the Organizing Committee
SMAB


Dra. Romina Rodríguez Sonoja
President of the Scientific
Committee SMAB/GIM


Dr. Sergio Sánchez Esquivel
President of the Organizing
Committee GIM


Dr. Stefano Donadio
President of GIM



ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PECTIN FROM PRICKLY PEAR PEEL (*Opuntia albicarpa* S.)

Sixto J. Pérez-Campos; Norberto Chavarría-Hernández; Guillermo A. López-Huape; Adriana I. Rodríguez-Hernández.

Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, ICAP, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. Av. Universidad km.1. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, C.P. 43600. México.
sixtojosue@gmail.com

Key words: pectin, cavitation, ultrasound

Introduction. Pectin is a complex polysaccharide present in the cell walls of higher plants. Extracted pectin is widely used as thickener, stabilizer or gelling agent in the food and pharmaceutical industries. The convective extraction methods of vegetal polysaccharides depend largely on energy input (agitation, solvent temperature) to improve mass transfer; hence they are time consuming and low productivity processes. Ultrasound assisted extraction (UAE) is a novel technique that consists in the application of high intensity ultrasound to the raw material in the extraction media, creating continuous high-low pressure cycles, which generate a cavitation phenomenon that lead to cell disruption and to the mass transfer improvement (1).

The objective of this work is to study the effect of power input and time of ultrasound on the yield and the productivity of the extraction process of calcium-bonded pectins from prickly pear peel (*O. albicarpa* Scheinvar 'Reyna'). The chemical and rheological characterizations of the extracted polysaccharides are also reported.

Methods. Fresh prickly pears (*O. albicarpa* Scheinvar 'Reyna') were collected from plantations in San Martín de las Pirámides, Estado de México, Mexico. Prickly pear peel were leached with deionized water at 60°C for 2 h in order to remove mucilages; then, peel were re-suspended in an aqueous solution of 0.5% EDTA and the suspension was sonicated. An ultrasonic processor (Sonics & Materials, VCX-1500; 1500 W) equipped with a 20 kHz probe was used. Temperature was controlled at 60 °C. Two levels of power input (450, 1350 W) and four sonication periods (5, 10, 15 & 30 min) were evaluated. The polymer extracted was precipitated with 96% ethanol, dried at 40°C and analyzed on chemical composition and rheological properties. The results are compared to those obtained in "the convective extraction" which was carried out in a stirred tank at 550 rpm, 60 °C for 2 h.

Results. The yield of pectin extraction increased with the sonication time. A larger yield of polysaccharides occurred with power input of 1350 W at the latter periods. The yields of 10 and 15 minutes were comparable to those achieved by the conventional method. On the other hand, the productivity of all treatments was significantly higher (i.e. 4 to 14 gL⁻¹h⁻¹) to that of convective extraction (i.e. 0.75 gL⁻¹h⁻¹) (Fig. 1). The prickly pear pectin dispersions showed a non-Newtonian rheological behavior. Their apparent viscosities were significantly higher than commercial citrus pectins.

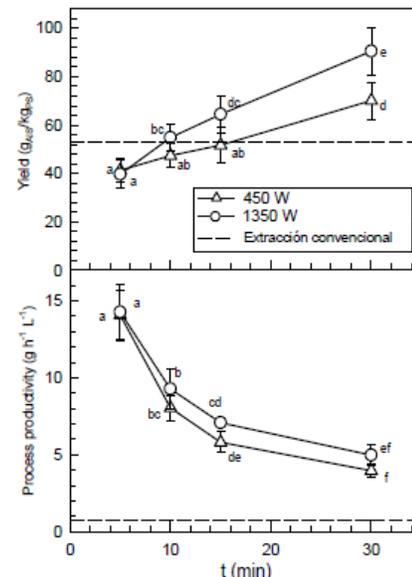


Fig.1 Extraction yield (ratio of alcohol insoluble solids (AIS) to prickly pear peel solids (PS)) and productivity of the extraction process, as a function of sonication time. The line shows the value corresponding to conventional extraction (2h, 60°C, stirred tank).

Conclusions. UAE have demonstrated to be an efficient process to extract calcium-bonded pectins from by-products of prickly pear.

Acknowledgements. Financial support from "Biotecnologías basadas en biomoléculas funcionales para el sector agroalimentario" PROMEP, SEP, 2012 and scholarship to S. J. Pérez-Campos (CONACyT) are gratefully acknowledged.

References.

1. Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J.A. (2011). *Food Eng Rev*, 3 (2): 108–120.