APLICACIÓN DE PROCESOS QUÍMICOS Y BIOTECNOLÓGICOS PARA LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS DE INTERÉS INDUSTRIAL

Práctica 4

Tipo de práctica	Duración	Indicaciones de peligro
Grupal	12 horas	

OBJETIVOS

- Identificar las materias primas de origen natural para la obtención del extracto de interés de acuerdo con las necesidades del sector industrial colombiano.

- Establecer los procedimientos físicos, químicos y/o microbiológicos para la obtención del extracto de interés industrial.

- Caracterizar física y químicamente el extracto obtenido de acuerdo a las necesidades del proyectos

1. FUNDAMENTO

Los polímeros a base de carbohidratos, como el almidón, la celulosa, el quitosano y la pectina, se han consolidado como recursos versátiles y valiosos en la tecnología alimentaria. Estos polímeros de origen natural ofrecen una amplia gama de aplicaciones como estabilizadores, sustitutos de grasas, emulsionantes, etc., en la industria alimentaria, y aportan funcionalidades distintivas a los productos alimenticios. La pectina, reconocida por sus notables propiedades gelificantes, suele actuar como agente gelificante clave, transformando formulaciones líquidas en geles estables, aportando texturas deseables y mejorando la calidad del producto.

La pectina, un polisacárido natural presente en las paredes celulares de las plantas, está compuesta principalmente por unidades repetitivas de ácido D-galacturónico unidas mediante enlaces α-(1-4). Dependiendo de la fuente vegetal, la estructura de la pectina puede consistir en dominios de homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II). Esta diversidad en la composición explica las propiedades únicas que presentan las diferentes pectinas, como su gelificación, solubilidad y comportamiento reológico.

Como en otros biopolímeros, las propiedades funcionales de las pectinas dependen en gran medida de factores intrínsecos de la molécula como su masa molecular y grado de esterificación (DE), que a su vez dependen de la materia prima, del estado de madurez del fruto y de las condiciones de extracción y de almacenamiento, entre otros. Las estructuras pécticas se pueden ver alteradas fundamentalmente por desmetoxilación y despolimerización inducidas o espontáneas durante su obtención, procesado y posterior conservación. En ambos casos estos efectos se intensifican a medida que las condiciones de temperatura y humedad relativa incrementan, aunque no responden de la misma manera todos los tipos de pectinas. Además, factores extrínsecos tales como pH, sales disueltas y la presencia de azúcares también influyen en estas reacciones.

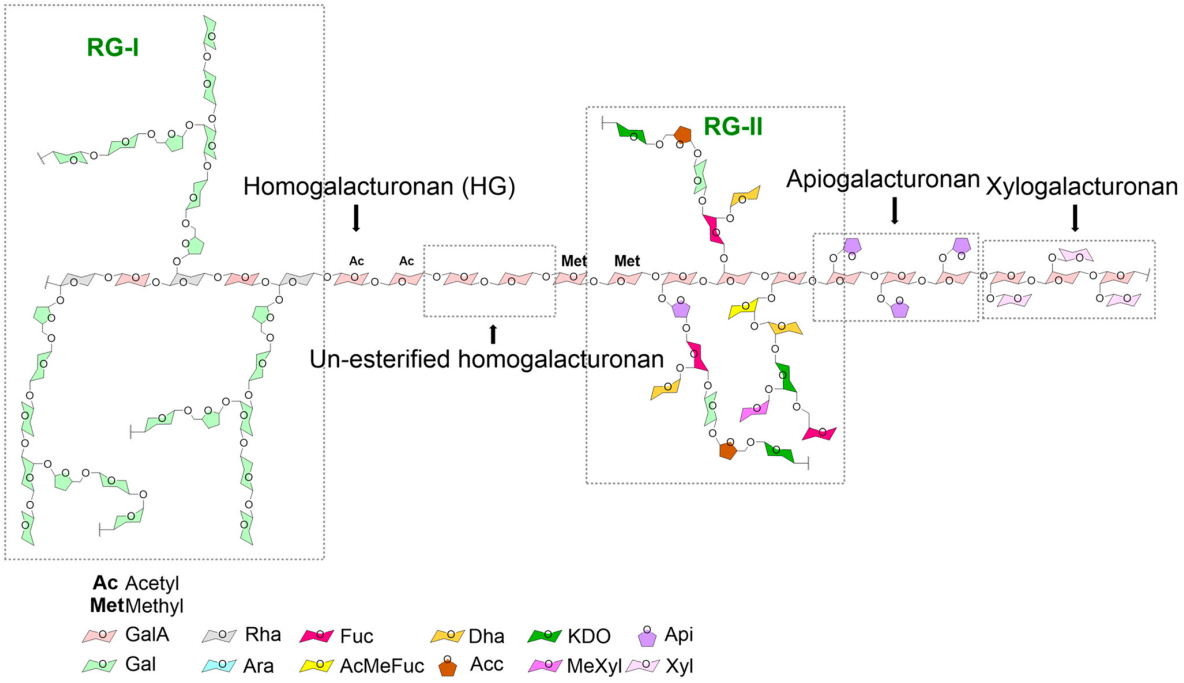


Figura 1. Pectina y sus variaciones estructurales. (Food Funct., 2022, 13, 10870–10881)

Las pectinas de las frutas, y en general de los materiales vegetales, varían en el contenido de metoxilo y poder de gelificación, así como también en la presencia y las posiciones de otros grupos químicos como amidas y etoxilo. El contenido de metoxilo en las pectinas comerciales se encuentra entre el 8 y el 11%, pueden formar geles con un contenido de 65% de sólidos solubles (azúcar). También varían en la longitud de la cadena y los elementos involucrados en su estructura, lo cual compromete su capacidad de fluir. Desde el punto de vista del contenido de metoxilo, o sea del número de grupos carboxilos esterificados con metanol, se distinguen dos tipos, pectinas de alto metoxilo y pectinas de bajo metoxilo.

1.1. Pectinas de alto metoxilo. Son aquellas en las cuales más del 50 % de los grupos carboxilos del ácido galacturónico del polímero se encuentra esterificado con metanol como se puede ver en la Figura 2. Estas pectinas son capaces de formar geles en condiciones de pH entre 2.8 y 3.5 y un contenido de sólidos solubles (azúcar) entre 60 % y 70 %.

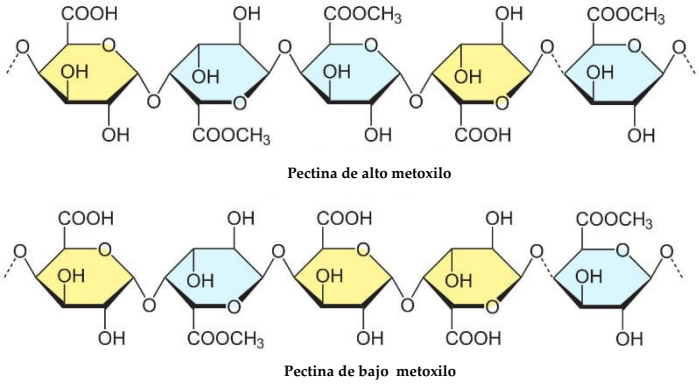


Figura 2. Grado de metoxilo de pectinas.

1.2. Pectinas de bajo metoxilo. Son aquellas en las cuales menos del 50% de los grupos carboxilo están esterificados con metanol. Para la formación del gel requieren la presencia de cationes divalente,

generalmente se emplea calcio. En este caso la formación del gel ocurre por la formación de enlaces de dichos cationes con moléculas de pectina, formando una red tridimensional con los grupos carboxilo de ésta. Los geles se pueden obtener entre pH 1 a 7; el pH no afecta la textura del gel ni el intervalo de sólidos solubles y puede fluctuar entre 0 y 80%, pero la presencia de calcio es el factor predominante en la formación del gel.

1.3. Propiedades físicas y químicas de las pectinas. Las características químicas de las pectinas que influyen en la fuerza del gel son el grado de esterificación y el peso molecular. La habilidad de la pectina a gelificarse también depende de su solubilidad, viscosidad y de su peso molecular.

1.4. Peso molecular: Relacionado con la longitud de la cadena, es una característica muy importante de la que dependen la viscosidad de sus disoluciones y su comportamiento en la gelificación.

1.5. Acidez: Esta propiedad de las disoluciones de pectina varía según el grado de esterificación y pH, en su estado natural son neutras y en solución pueden tener carácter ácido. Se considera que deben presentar un pH entre 2.8 y 3.4 como función del grado de esterificación.

1.6. Grado de esterificación (GE): Las pectinas se pueden clasificar según su GE en pectinas de alto metoxilo (AM) (más del 50 % de grupos carboxilo están esterificados) y pectinas de bajo metoxilo (BM) (< 50 %). El número y distribución de los grupos metílicos a lo largo de la molécula juegan un papel muy importante en la solubilidad, capacidad espesante y capacidad de gelificación de las pectinas, características que determinan las propiedades del gel formado.

1.7. Porcentaje de metoxilo: El porcentaje de metoxilación determina la característica gelificante de la pectina, mediante la relación entre la masa total de éster metílicos sobre la masa total de la pectina. Las pectinas comerciales pueden formar geles con un contenido del 65 % de azúcar, si su contenido de metoxilo está entre el 8 % y 11 %.

1.8. Porcentaje de ácido galacturónico: Es un referente que permite visualizar el grado de pureza de la sustancia péctica, debido a que este polisacárido debe encontrarse constituido en su mayoría por ácido galacturónico en presencia de otros azúcares.

1.9. Solubilidad: Las pectinas se disuelven con facilidad en el agua y en otras sustancias como la formamida, dimetilformamida y glicerina caliente, y es insoluble en agentes empleados para su precipitación después de un proceso de hidrólisis por tratamiento de la materia prima, como los solventes orgánicos y soluciones de detergentes. Es importante disolver completamente la pectina para que pueda ser utilizada en su totalidad evitando la formación de geles irregulares y grumos, pues no se rompen con facilidad una vez formados.

1.10. Poder de gelificación: Para la formación de geles es importante la presencia de azúcares dado a la acción deshidratante y cambio en la electronegatividad de las cadenas de la pectina. La cristalización de los fragmentos de la cadena molecular es otro factor indispensable para la gelificación de la pectina, pues puede ser limitada por una red tridimensional en donde se encuentra unida a sustancias como agua, azúcares y otros, mediante puentes de hidrógeno.

2. MATERIALES Y REACTIVOS

3 Cápsulas de porcelana
3 Crisoles de porcelana

2 Vasos de precipitado 100 mL
2 Vasos de precipitado 250 mL
2 Vasos de precipitado 500 mL
1 Vaso de precipitado 1000 mL
2 Pipetas de 10 mL (aforada y graduada)
2 Pipetas de 5 mL (aforada y graduada)
1 Pipeta de 2 mL aforada
2 pipetas Pasteur
1 Bureta de 25 mL
1 probeta de 100 mL
2 Erlenmeyer con tapa de 250 mL
2 Balón aforado 500 L
2 Montajes de reflujo (balón de destilación 500 mL, condensador de bolas)
1 Termómetro de 0-300 ° C
2 vidrios de reloj
1 Cápsula de porcelana
Pipeteador
Plancha de calentamiento
1 embudo de filtración.
Papel filtro.
Vidrio de reloj
Espátula
1 caja de papel indicador de pH
Varilla de vidrio agitadora
Tela filtrante
Balanza analítica
pH-metro
Agua destilada.
Ácido clorhídrico concentrado
Fenolftaleína. (Solución al 1 % en alcohol de 95 %)
Alcohol etílico al 95 %
Hidróxido de sodio
Etanol 96 %
Indicador rojo de fenol
Naranja de metilo
Ftalato ácido de potasio anhidro
Carbonato de sodio anhidro
Estufa con control de temperatura
Desecador con agente desecante
Mufla a 550 °C
Calibrador Vernier (pie de rey)
Bolsas Ziploc

3. PROCEDIMIENTO

3.1. Muestreo

Defina todas las características del muestreo que realizó para la obtención de la materia prima (cáscaras de naranja o maracuyá):

Fecha del muestreo:

Lugar del muestreo:

Variedad:

Técnica de muestreo (dadas las característica que se requieren en la materia prima, se recomienda un muestreo por conveniencia):

Conservación de las muestras:

Almacenamiento y transporte:

Tome evidencias fotográficas.

3.2. Preparación de las cáscaras

Generalmente las cáscaras de cítricos verdes contienen mayor cantidad de pectinas y por lo tanto se logra un mejor rendimiento. Es importante seleccionar cáscaras en buen estado, es decir, sin hongos, gusanos o partes en descomposición. Una vez escogidas éstas, separar manualmente el mesocarpio o albedo (parte blanca de la cáscara) de la epidermis o exocarpio de la cáscara (flavedo) (Figura 1), esto con el objetivo de obtener una pectina más pura y de color claro. Para aumentar el área superficial de contacto es recomendable reducir el tamaño de los pedazos del albedo resultante, que se van a usar en el proceso de extracción. Tomar evidencias fotográficas de todos los procedimentos relevantes.



***Figura 1**. Partes de la cáscara de naranja. Tomado de Higuera Tarazona (2019).*

3.3. Caracterización de las cáscaras

3.3.1. Determinación de características físicas

Determine las características físicas de la materia prima y llene la Tabla 1.

3.3.2. Determinación de humedad

Principio

Deshidratación de la muestra por calentamiento en estufa a 105 °C, hasta peso constante.

Procedimiento

Lavar y secar una cápsula de porcelana, marcarlo (usar lápiz) y colocarlo en una estufa a 105 °C durante media hora, dejar enfriar en un desecador y pesarlo (registrar este peso en su cuaderno de laboratorio).

Pesar aproximadamente 5 g de muestra, en la cápsula de porcelana, previamente tarada, colocar en la estufa a 105 °C por 3 horas, pasar al desecador, enfriar y pesar. Repetir la operación hasta peso constante. La pérdida de masa se considera como humedad.

Análisis de resultados

$$\% \boldsymbol{Humedad} = \frac{\boldsymbol{A - B}}{\boldsymbol{A - C}} * \mathbf{100}$$

Donde

$A = Peso\ de\ la\ cápsula\ más\ la\ muestra, en\ gramos.$
$B = Peso\ de\ la\ cápsula\ más\ la\ muestra\ seca, en\ gramos.$
$C = Peso\ de\ la\ cápsula\ vacía, en\ gramos.$

Calcular el porcentaje de materia seca:

$$\% \boldsymbol{Materia\ seca} = \mathbf{100} - \% \boldsymbol{Humedad}$$

3.3.3. Determinación de cenizas

Principio

El método es aplicable a todos los tipos de productos alimenticios, con excepción de los alimentos ricos en grasa (50%).

Procedimiento

Secar un crisol de porcelana, marcarlo (usar lápiz) y colocarlo en una mufla a 500 °C durante media hora, dejar enfriar en un desecador y pesarlo (registrar este peso en su cuaderno de laboratorio).

Pesar con precisión 5 g de muestra homogenizada, en un crisol, previamente tarado. Secar en la estufa, carbonizar a temperatura baja e incinerar en la mufla a 550 °C.

Incinere hasta que las cenizas adquieran un color blanco o grisáceo. Enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente y pesar de inmediato.

Análisis de resultado

$$\% \boldsymbol{Cenizas} = \frac{\boldsymbol{g\ ceniza}}{\boldsymbol{g\ muestra}} * \mathbf{100}$$

Nota: Elevar lentamente la temperatura de la mufla hasta alcanzar la incineración (sin que se formen llamas).

3.4. Preparación y estandarización de una solución 0,1 N de NaOH por pesada directa del patrón primario biftalato de potasio.

Calcular los gramos necesarios de hidróxido de sodio para preparar 250 mL de solución de NaOH 0,1 N. Pesar la cantidad calculada, transferirlos a un vaso de precipitados de 50 mL, disolver con un poco de agua destilada y luego transferir el contenido a un matraz aforado de 250 mL. Recuerde llenar parcialmente el matraz con agua destilada antes de agregar los gramos de NaOH. Enrasar con agua destilada hasta el aforo (no se debe completar a volumen hasta que la solución esté fría). Trasvasar a un frasco plástico limpio y rotular.

Titulación o estandarización de la solución de NaOH anteriormente preparada por pesada directa del patrón primario biftalato de potasio:

a) Pesar biftalato de potasio (hacer los cálculos para determinar cuánto pesar) y pasarlos cuantitativamente a un vaso de precipitados de 50 mL, disolver con un poco de agua destilada y luego transferir el contenido a un matraz Erlenmeyer, disolverlos en 30 mL de agua destilada y agregar 2 gotas de solución indicadora fenolftaleína (solución al 0,1% p/v en etanol).

b) Desde una bureta agregar gota a gota la solución de NaOH 0,1 N preparada, agitando durante la adición, hasta la aparición de un color rosa permanente. Anotar el volumen gastado. Calcular la normalidad de la solución de NaOH que se preparó. Informar el resultado con su desviación estándar y expresar la concentración con el número correcto de cifras significativas.

3.5. Preparación y estandarización de una solución 0,25 N de HCl a partir de una solución de ácido clorhídrico de grado analítico (37 % de pureza en peso y ρ=1,19 g/mL).

Calcular el volumen necesario de la solución analítica de HCl para preparar 250 mL de solución de HCl 0,25 N. Tomar con una pipeta graduada el volumen calculado de HCl y transferir ese volumen a un matraz aforado de 250 mL. Recuerde llenar parcialmente el matraz con agua destilada antes de agregar el HCl concentrado. Enrasar con agua destilada hasta el aforo (no se debe completar a volumen hasta que la solución esté fría). Trasvasar a un frasco de vidrio limpio y rotular.

Titulación o estandarización de la solución de HCl anteriormente preparada:

Valoración con solución de NaOH 0,25 N: medir con una pipeta aforada, 5 mL de la solución de HCl 0,25 N y pasarlos a un Erlenmeyer, agregar aprox. unos 50 mL de agua destilada y 2 gotas de solución indicadora fenolftaleína (solución al 0,1% p/v en etanol). Desde una bureta agregar gota a gota la solución de NaOH 0,25 N, agitando durante la adición, hasta la aparición de un color rosa permanente. Anotar el volumen gastado. Calcular la normalidad de la solución de HCl que se preparó. Informar el resultado con su desviación estándar y expresar la concentración con el número correcto de cifras significativas.

3.6. Extracción de pectinas de las cáscaras

Pese entre 50 g y 100 g de cáscaras previamente secadas a 50 °C por 24 h (o hasta peso constante) y picadas en trozos pequeño y registre con precisión de la cantidad de cáscara pesada (Este dato se usa en el cálculo del porcentaje de rendimiento).

Lave las cáscaras con 150 mL de agua destilada caliente (100 °C) y déjela en esta en reposo por 10 minutos.

Realice el montaje de reflujo tal como se muestra en la figura 3.

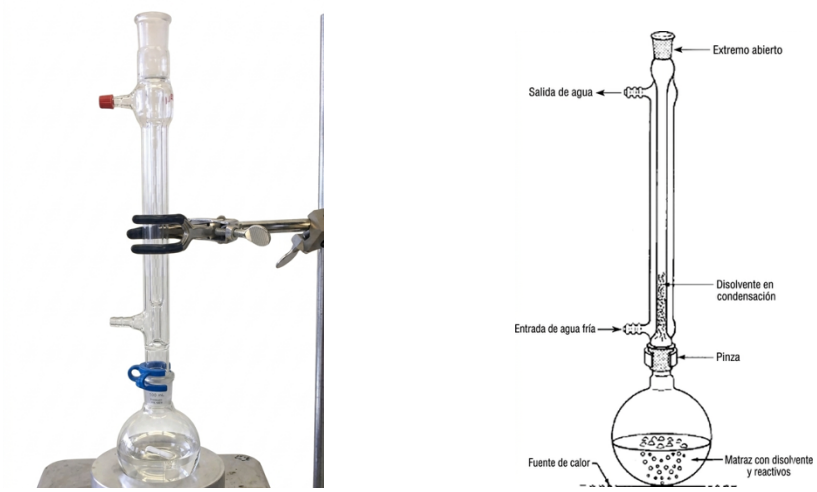


Figura 3. Montaje para reflujo.

Retire el agua y transfiera las cáscaras a cada uno de los balones de destilación. Después adicione 250 mL del HCl diluido al pH que le corresponda a su grupo de trabajo (de acuerdo con el diseño experimental).

Llevar a la temperatura de acuerdo con su diseño experimental contando el tiempo a partir de que se alcance dicha temperatura y bajo agitación constante (Por ejemplo, 60 °C por 1 hora). Monitoree constantemente la temperatura usando un termómetro.

Finalizado el tiempo de calentamiento apague la plancha, retire el montaje.

Filtre el líquido, usando una tela filtrante, evitando tener material vegetal sólido.

Mida el pH y neutralice adicionando gota a gota NaOH al 10% hasta dejar el pH entre 6 y 8.

3.7. Precipitación de la pectina

Con ayuda de una probeta, mida el volumen total del líquido obtenido, transfiéralo a un vaso de precipitados de 500 mL.

Adicione la misma cantidad de etanol al 96 % que tenga de líquido producto de la extracción (esta mezcla va en una proporción 50:50).

Agite vigorosamente con una varilla de vidrio.

Lleve la mezcla a la nevera por al menos 1 h para permitir la total precipitación de las pectinas.

3.8. Separación de la pectina

Separe el líquido cuidadosamente del sólido evitando agitar el vaso de precipitados En caso de no poder hacer la separación fácilmente, use una tela filtrante.

3.9. Secado de la pectina

Transfiera las pectinas separadas a una cápsula de porcelana previamente estabilizada y pesada.

Lleve la cápsula de porcelana con las pectinas a un horno de secado a 65 ºC.

Evite usar papel aluminio para secar las pectinas, se van a adherir sin poder despegarse y perderán todo el proceso.

Una vez secas las pectinas, pese el total obtenido para calcular el porcentaje de rendimiento de la pectina basados desde la masa inicial de cáscaras.

$$\%Rendimiento = \frac{gramos\ de\ la\ pectina\ extraída}{gramos\ iniciales\ de\ cáscara} * 100$$

4. CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA

4.1. Determinación del peso equivalente y acidez libre.

Pese 0.5 g de pectina seca y transfiera cada masa a un Erlenmeyer de 250 mL con tapa esmerilada.

Adicione 5 mL de etanol al 96 %.

Adicione 100 mL de agua destilada.

En caso de ser necesario, caliente las muestras para mejorar la solubilidad.

Adicione de 3 a 5 gotas de indicador rojo de fenol.

Titule lentamente, para evitar posible des-esterificación, con NaOH 0,1 N hasta el viraje final (pH 7.5). No deseche la solución contenida en el Erlenmeyer, se usa en la determinación del contenido de metoxilo.

Mediante la siguiente ecuación puede estimar el peso equivalente:

$$Peso\ equivalente\ (Pe) = \frac{gramos\ de\ la\ pectina}{equivalentes\ de\ NaOH}$$

$$Peso\ equivalente\ (Pe) = \frac{gramos\ de\ la\ pectina\ extraída}{N\ deNaOH * V\ de\ NaOH\ en\ litros}$$

Mediante la siguiente ecuación se puede calcular la acidez libre:

$$Acidez\ libre = \frac{equivalentes\ de\ NaOH}{g\ de\ pectina}$$

4.2. Determinación del contenido de metoxilo

Tome las muestras de la valoración anterior y adicione 25 mL de NaOH 0,25 N.
Tape el Erlenmeyer y deje reposar por 30 min a temperatura ambiente.

Adicione 25 mL de HCl 0,25 N y agite constantemente.
Titule usando NaOH 0,1 N con rojo de fenol como indicador hasta el viraje del indicador (rojo) como antes.
Mediante la siguiente ecuación puede calcular el porcentaje de metoxilos:

$$\%\ Metoxilo\ (CH_3O) = \frac{equivalentes\ de\ NaOH * PM\ metoxilo}{g\ de\ pectina} * 100$$

$$\%\ Metoxilo\ (CH_3O) = \frac{N\ de\ NaOH * V\ de\ NaOH\ en\ litros * 31}{g\ de\ pectina} * 100$$

Donde 31 g/mol es el peso molecular del metoxilo.

4.3. Determinación del grado de esterificación.

Se calcula dividiendo los miliequivalentes del hidróxido de sodio gastados en la determinación del contenido de metoxilo por la suma de los miliequivalentes de hidróxido de sodio gastados en la determinación de la acidez libre y los gastados en la determinación del contenido de metoxilo y multiplicando este valor por 100.

$$Grado\ de\ esterificación\ (GE) = \frac{meq\ (B)NaOH}{meq\ (A)NaOH + meq\ (B)\ NaOH} * 100$$

Donde:

- meq A (NaOH): meq de NaOH utilizados en la titulación de peso equivalente y acidez
- meq B (NaOH): meq de NaOH utilizados en la titulación de % Metoxilo

4.4. Determinación del porcentaje de ácido galacturónico.

El método consiste en emplear los datos registrados de las titulaciones realizadas para determinar el grado de esterificación anteriormente detallado y calcular los miliequivalentes de hidróxido de sodio gastados en cada valoración.

$$\%\ Ác\ Anhhidro\ galacturónico = \frac{176 * 100 - [\ meq\ (B)NaOH + meq\ (A)NaOH]}{mg\ de\ pectina}$$

Donde

- 176: peso molecular del ácido anhídrido galacturónico expresado en mg/meq
- meq A (NaOH): meq de NaOH utilizados en la titulación de peso equivalente y acidez
- meq B (NaOH): meq de NaOH utilizados en la titulación de % Metoxilo

5. HOJA DE RESULTADOS.

Organice sus datos y resultados en tablas para facilitar su registro y análisis.

Calcule el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en los casos que sea posible hacerlo.

Compare los resultados obtenidos con el valor esperado.

Realice un análisis de resultados para cada ensayo realizado, identificando a que se debe el resultado obtenido y que implicaciones tiene.

Tabla 1. Características de la materia prima

Características	**Valores**
Peso del fruto [g]	
Diámetro del fruto [mm]	
Grados de color	
Grosor de la cáscara [mm]	

Resultado: promedio ± Coeficiente de variación

Tabla 2. Determinación de la humedad de las cáscaras

Peso de la cápsula 1 vacía [g]	Peso de la cápsula 2 vacía [g]	Peso de la cápsula 3 vacía [g]
Peso de la cápsula 1 más la muestra [g]	Peso de la cápsula 2 más la muestra [g]	Peso de la cápsula 3 más la muestra [g]
Peso de la cápsula 1 más la muestra seca [g]	Peso de la cápsula 2 más la muestra seca [g]	Peso de la cápsula 3 más la muestra seca [g]
% Humedad 1	% Humedad 2	% Humedad 3
% Humedad promedio ± Coeficiente de variación		
% Materia seca promedio ± Coeficiente de variación		

Tabla 3. Determinación de cenizas de las cáscaras

Peso del crisol 1 vacío [g]	Peso del crisol 2 vacío [g]	Peso del crisol 3 vacío [g]
Peso del crisol 1 más la muestra [g]	Peso del crisol 2 más la muestra [g]	Peso del crisol 3 más la muestra [g]
Peso del crisol 1 más cenizas [g]	Peso del crisol 2 más cenizas [g]	Peso del crisol 3 más cenizas [g]
% Cenizas 1	% Cenizas 2	% Cenizas 3
% Cenizas promedio ± Coeficiente de variación		

Tabla 4. Estandarización de la solución 0,10 N de NaOH por pesada directa del estándar primario biftalato de potasio.

Valoración N°	Masa de biftalato de potasio [g]	Volumen de NaOH empleado en la valoración [mL]	Concentración de NaOH [N]
1			
2			
Concentración del NaOH [N] Promedio ± Coeficiente de variación			

Tabla 5. Estandarización de la solución 0,25 N de HCl mediante la solución de NaOH estandarizada.

Valoración N°	Volumen de NaOH empleado en la valoración [mL]	Concentración del HCl [N]
1		
2		
Concentración del HCl [N] Promedio ± Coeficiente de variación		

6. BIBLIOGRAFIA

Vargas Fiallo, Luz Yolanda y Camargo, Jaime H.. Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Química I. Universidad Industrial de Santander. Página 118-124.

Mendoza-Vargas, L.; Jiménez-Forero, J.; Ramírez-Niño: M.: Extracción enzimática de pectina. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 20 (1): 131 – 138.

7. **RESPONSABLES DE LA LOGÍSTICA (GRUPO #3)**

CABINAS: MAYCOL DAVID GOMEZ ANTOLINEZ
REACTIVOS: SANTIAGO CASTELLANOS BAEZ
MATERIAL: CRISTIAN DAVID BEJARANO SERRANO
BALANZAS: SANTIAGO CASTELLANOS BAEZ
EQUIPOS: SANTIAGO CASTELLANOS BAEZ
MESONES: MAYCOL DAVID GOMEZ ANTOLINEZ
PISO:GRUPO 4
POCETAS: MAYCOL DAVID GOMEZ ANTOLINEZ