



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Caracterización de pectinas industriales de cítricos y su aplicación como recubrimientos de fresas

Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos

Ana Muñoz Labrador

Madrid, septiembre 2016

Directores:

Dra. María del Mar Villamiel Guerra

Dra. Antonia Montilla Corredera



Esta actividad de investigación, fundamentada como Trabajo Fin de Máster, es la culminación del “Máster Química Agrícola y Nuevos Alimentos”, realizado durante el intervalo del Curso 2015-2016. Este trabajo lleva por título “Caracterización de pectinas industriales de cítricos y su aplicación como recubrimientos de fresas”, y ha sido llevado a cabo en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL, bajo la dirección y supervisión de las Dras. María del Mar Villamiel Guerra y Antonia Montilla Corredera (CSIC), siendo la Dra. Tiziana Fornari Reale (UAM) la tutora del mismo.

Madrid, a 12 de Septiembre de 2016

Vº Bueno de Directores y Tutora

Fdo:

Dra. M^a Mar Villamiel Guerra

Dra. Antonia Montilla Corredera

Dra. Tiziana Fornari Reale

RESUMEN

Una mayor demanda por parte de los consumidores de productos más saludables y la necesidad de minimizar la contaminación del medio ambiente ha incentivado, a los investigadores y a la industria, a explorar nuevas maneras de utilizar los subproductos que se generan en la industria agroalimentaria para la obtención de ingredientes funcionales, de hecho, en los últimos años, esto se ha considerado uno de los retos más importantes. En el sector hortofrutícola español uno de los subproductos más importantes son los obtenidos de la extracción de zumo de cítricos (piel, pulpa y semillas), muy ricos en pectinas. Estos polisacáridos son una de las familias más complejas y abundantes, presentes en las paredes celulares de las plantas y están formadas por unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces α -(1-4) y cadenas laterales de ramnogalacturonano. Estos biopolímeros presentan propiedades biológicas que los hacen adecuados para su uso en la industria farmacéutica así como en la industria alimentaria, destacando, para este sector, sus propiedades prebióticas y tecnofuncionales por su poder gelificante y estabilizante. Por todo ello, en el presente trabajo se ha realizado una caracterización proximal y estructural de pectinas industriales procedentes de cítricos, así como su evaluación reológica, con el fin de ser empleadas como recubrimientos durante la conservación de fresas frescas. Los resultados indicaron que estas pectinas mostraban un grado de esterificación (DE), determinado por espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR), superior al 50% y un contenido de ácido galacturónico >65 % en la pectina pura (analizado por GC-FID tras hidrólisis ácida con TFA 2M) pudiendo ser, por tanto, consideradas como aditivo E-440. Según el estudio reológico (análisis de la viscosidad en función de la fuerza de cizalla) estas pectinas presentan distintas viscosidades, lo que las hace idóneas para diferentes usos y, por otra parte, los métodos de preparación posibilitan obtener geles con una más amplia gama de valores de viscosidad, ampliando aún más sus posibilidades de uso. Por último se estudió su utilización como recubrimiento observándose, en la mayoría de los casos, una menor pérdida de humedad, especialmente en las fresas recubiertas con la pectina 4710 preparada con agitador de varilla y de la 4400 preparada en placa, ambas tratadas posteriormente con ultrasonidos (30 min 30% de amplitud), presentando estas fresas mejores características de color (L^* , a^* , b^* , C , h , ΔE), que el control tras 5 días de almacenamiento.

ABSTRACT

A growing consumer demand for healthier products and the necessity to minimize the environmental impact, have recently spurred researchers and the industry to develop ways to use the by-products from the food industry to obtain functional ingredients. Indeed, in the last years it has been considered one of the most important issues. In the Spanish fruit and vegetable processing sector, one of the most important by-product is obtained from the citrus extraction (skin, pulp, seeds) rich in pectin. These are one of the most abundant and complex polysaccharides, found in the cell walls, and are chemically constituted by poly α -1-4-D-galacturonic acids and lateral chains of rhamnogalacturonan. These biopolymers present biological properties which make them appropriate to be used in the pharmaceutical and food industry, highlighting the prebiotic and techno functional properties and the gelation and emulsion stabilizing capacity. In this work, a proximal and structural characterization of industrial citrus pectin has been done, together with a rheological evaluation to be used as edible coating in fresh strawberries during storage. The results indicate that the pectin showed a esterification degree (DE), determined through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), greater than 50% and galacturonic content >65 % in the pure pectin (analyzed by GC-FID after acid hydrolysis with TFA 2M) which may be considered as additive E-440. Furthermore, in the rheological study (viscosity analysis by the shear stress) these pectin present different viscosity ranges, suitable for many different uses and the preparation methods offering the possibility to obtain gels with different viscosity ranges, further increasing the possibility of uses. Finally we studied its utilization as edible coating which showed in the majority of cases a lesser humidity loss, especially in strawberries coated with the pectin 4710 prepared by overhead stirrer, and pectin 4400 prepared by heating magnetic stirrer, both treated afterwards with ultrasound (over a period 30 min 30% amplitude), presenting these strawberries improved color characteristics (L^ , a^* , b^* , C , h , ΔE) than the control samples after storage over a period of 5 days.*

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AGA	Apiogalacturonano
AGal	Ácido galacturónico
a_w	Actividad de agua
DE	Grado de esterificación
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
HG	Homogalacturonano
HMP	Pectinas de alto metoxilo
HPLC-ELSD	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplado al Detector Evaporativo de Dispersión de Luz
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo
LMP	Pectinas de bajo metoxilo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M_w	Masa molecular
RG-I	Ramnogalacturonano tipo I
RG-II	Ramnogalacturonano tipo II
RID	Detector de índice de refracción
RM	Reacción de Maillard
SEC	Separación por exclusión molecular
SIDI-UAM	Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid
US	Ultrasonidos de potencia

FIGURAS

Figura 1 Estructura simplificada de la pectina (Gullón y col. 2013)	2
Figura 2 Estructura de las pectinas de acuerdo a su contenido de metoxilo: A) Pectinas de alto metoxilo (HMP) B) Pectinas de bajo metoxilo (LMP) (IPPA 2001).....	4
Figura 3 Modelo hipotético de la estabilización de emulsiones por pectinas (Leroux y col. 2003).....	5
Figura 4 Estructura “egg box” (Eliaza y col. 2007).....	6
Figura 5 Distribución general de aplicaciones de la pectina (Brehnholt 2010)	9
Figura 6 Esquema general del plan de trabajo llevado a cabo	14
Figura 7 Esquema del proceso de obtención de las pectinas industriales	16
Figura 8 Detector ELSD acoplado a HPLC	20
Figura 9 Condiciones de tiempo y velocidad de cizalla para los dos tipos de curvas de flujo: A) 0-1000 s-1 (300 s) / 1000 s-1 (60 s) / 1000-0 s-1 (300 s) B) curva de flujo a 0-1000 s-1 (30 s) / 1000 s-1 (600 s) / 1000-0 s-1 (30 s)	22
Figura 10 Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de los TMS-oximas de los carbohidratos presentes en la pectina 4400 tras su hidrólisis con TFA 2 M durante 4 h a 110 °C	27
Figura 11 Monosacáridos liberados durante la hidrólisis ácida (TFA 2M, 110 °C) de las pectinas industriales	28
Figura 12 Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de la pectina 4400 (A) Y 4710 (B) sin hidrolizar.....	30
Figura 13 Recta de calibrado para la estimación de la M_w media	32
Figura 14 Recta de calibrado con una correlación cuadrática (A) y lineal (B) para la determinación de la concentración de pectina mediante HPLC-ELSD	33
Figura 15 Cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD de las pectinas industriales: (A) pectina 4400 y (B) pectina 4710	35
Figura 16 Espectros FT-IR para la pectina 4400 (A) y 4710 (B).....	37
Figura 17 Termograma DSC de muestras de pectinas industriales	39
Figura 18 Curvas de flujo y viscosidad de los distintos tipos de comportamiento reológico (Moreno 2005) ..	40
Figura 19 Representación gráfica de la viscosidad y esfuerzo de cizalla en función de la velocidad de un gel de pectina 4400 preparado en placa magnética (3%).....	41
Figura 20 Representación de curvas de viscosidad pertenecientes al Programa A ($\gamma=0-1000$ s-1 (30 s); $\gamma=1000$ s-1 (600 s); $\gamma=1000-0$ s-1 (30 s)) de las pectinas preparadas con placa magnética y con varillas en el intervalo de 0 y 1000 s-1.....	42
Figura 21 Modelo de estructura tixotrópica en función del esfuerzo de cizalla aplicado (Barnes A. 1997).....	44
Figura 22 Curva de viscosidad modelo para un comportamiento tixotrópico (Barnes A. 1997)	45
Figura 23 Representación gráfica de las curvas de flujo y viscosidad CR (Controlled Rate) $\gamma=0-1000$ s-1 (300 s)- / $\gamma=1000$ s-1 (60 s) / $\gamma=1000-0$ s-1 (300 s) en función del tiempo (s) a 25 °C.....	46
Figura 24 Comparación visual de una fresa sin recubrimiento (izquierda) y una fresa con recubrimiento de solución de pectina (derecha) formada por placa magnética.....	47
Figura 25 Evolución del porcentaje en la pérdida de peso en fresa sin recubrir (control) y recubiertas con los diferentes geles de pectina y almacenadas a 4 °C	49
Figura 26 Evaluación de los parámetros de color L^* (A), a^* (B) y b^* (C), en fresa recubierta con pectina y en fresa sin recubrir, almacenadas durante 5 días a 4 °C	50
Figura 27 Variación del tono h° en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C	53
Figura 28 Variaciones de color de los distintos tratamientos en función del tiempo de almacenamiento	54
Figura 29 Crecimiento microbiológico en función del tiempo de almacenamiento	55

TABLAS

Tabla 1 Tabla-resumen de las propiedades más destacadas de las pectinas enfocadas hacia su uso en la industria farmacéutica y alimentaria	12
Tabla 2 Certificado de análisis de pectinas industriales procedentes de CEAMSA	17
Tabla 3 Códigos empleados para las distintas muestras preparadas.....	22
Tabla 4 Valores obtenidos de pH, aw, °Brix y extracto seco para las pectinas de cítricos 4400 y 4710	25
Tabla 5 Contenido en minerales de las pectinas (mg/g)	26
Tabla 6 Composición monomérica de las pectinas tras 4 h de hidrólisis ácida (valores expresados como % sobre monosacáridos totales)	29
Tabla 7 Condiciones de temperaturas y flujo del gas del diseño experimental ensayadas para la optimización del ELSD	31
Tabla 8 Estudio de linealidad, sensibilidad y límites de detección y cuantificación del ELSD.....	34
Tabla 9 Estudio de precisión del método HPLC-ELSD.....	34
Tabla 10 Cuantificación de la concentración y de la masa molecular media de los carbohidratos presentes en las pectinas industriales	36
Tabla 11 Bandas correspondientes al espectro FT-IR de las muestras de pectinas industriales	38
Tabla 12 Valores medios de viscosidad según la pectina, tratamiento y el programa empleado para evaluar las propiedades reológicas	43
Tabla 13 Valores de pH obtenidos los diferentes días del almacenamiento de las fresas recubiertas de pectina	48
Tabla 14 Parámetros de color de las fresas con los diferentes recubrimientos durante el almacenamiento..	52

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Características de la pectina	2
1.1.1	Características estructurales	2
1.1.2	Propiedades de las pectinas	3
1.2	Procedimientos de extracción y modificación de la pectina	7
1.2.1	Métodos químicos	7
1.2.2	Métodos físicos y enzimáticos.....	8
1.3	Aplicaciones de la pectina	9
1.3.1	Aplicaciones en la industria farmacéutica.....	9
1.3.2	Aplicaciones en la industria alimentaria.....	10
2	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	13
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1	Reactivos y muestras	15
3.1.1	Pectinas industriales.....	15
3.2	Métodos analíticos para la caracterización global de las pectinas	17
3.3	Métodos analíticos para la caracterización estructural de las pectinas.....	18
3.3.1	Análisis de la composición monomérica mediante cromatografía de gases (GC-FID).....	18
3.3.2	Análisis de la fracción de carbohidratos de bajo peso molecular por cromatografía de gases (GC-FID) 19	
3.3.3	Estimación de la masa molecular mediante cromatografía de líquidos con detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD).....	19
3.3.4	Estimación del grado de esterificación (DE) mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	21
3.3.5	Análisis térmico por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	21
3.4	Propiedades reológicas	21
3.4.1	Preparación de soluciones de pectinas	21
3.4.2	Medida de la turbidez de las soluciones de pectina.....	22
3.4.3	Determinación de las propiedades reológicas de las soluciones de pectina	22
3.5	Ensayos de conservación de fresas recubiertas con pectina	23
3.5.1	Recubrimiento de fresas.....	23
3.5.2	Evaluación de la calidad de las fresas con recubrimiento de pectina	23
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1	Caracterización de la pectina	25

4.1.1	Caracterización físico-química.....	25
4.1.2	Caracterización estructural.....	26
4.2	Propiedades de la pectina	38
4.2.1	Propiedades térmicas	38
4.2.2	Propiedades reológicas.....	40
4.3	Aplicación de la pectina en el recubrimiento de fresas	47
4.3.1	Estudio de la acidez	48
4.3.2	Pérdida de humedad	49
4.3.3	Parámetros del color	50
4.3.4	Análisis microbiológico	54
5	CONCLUSIONES	56
6	BIBLIOGRAFÍA	57

1 INTRODUCCIÓN

En la sociedad de hoy en día se ha incrementado el interés por los productos naturales y por ingredientes alimentarios con propiedades saludables y, paralelamente, se afrontan grandes costes energéticos, comienzan a escasear algunas materias primas y existe una importante contaminación del medio ambiente. A esto último también contribuye el sector hortofrutícola, en el cual una proporción importante de producto es tradicionalmente desechada, pudiendo generar grandes cantidades de materia contaminante. Estos subproductos, que consisten generalmente en cáscaras, semillas y pulpas de las frutas y verduras, tienen propiedades nutricionales de gran interés, con un gran potencial para la obtención de ingredientes funcionales, utilizables en formulaciones alimentarias (O'Shea y col. 2015; Laufenberg y col. 2003). Por todo ello, a nivel mundial, la preocupación acerca del aprovechamiento de subproductos ha tomado gran relevancia, tanto entre la comunidad científica como a nivel industrial, y se ha tomado conciencia de que los subproductos originados tras los procesos de transformación pueden revalorizarse y ser útiles en otras actividades.

Dentro del sector hortofrutícola el de los cítricos es de gran importancia y se ha convertido en una actividad integral donde participan empresas dedicadas a obtener distintos productos, frutas en fresco, pelada y troceada, producción de zumos, concentrados y pulpas. Sin embargo, a medida que la producción crece, aumenta también la generación de residuos sólidos y líquidos, los cuales están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, aceites esenciales, flavonoides y vitaminas (Marín y col. 2007; Laufenberg y col. 2003).

Actualmente, de la producción mundial de cítricos, más de 120 millones de toneladas en todo el mundo, el 40% es utilizado por la agroindustria para extraer cerca de la mitad del peso del fruto como zumo. El resto, la cáscara, semillas y pulpa, se convierte en residuos. Así, tan solo en España, la cantidad de residuos ascienden a 600.000 toneladas por año y se estima que, mundialmente, se generan alrededor de 20 millones de las mismas (Marín y col. 2007).

Todo ello lleva a los investigadores y a la industria a explorar diferentes formas de mejorar la productividad en términos de calidad y seguridad, disminuir la cantidad de residuos y utilizar estos para desarrollar nuevos productos e ingredientes con funcionalidades adicionales o mejoradas. Entre todos ellos, los carbohidratos han destacado debido al elevado contenido presente en estos subproductos y a sus numerosos campos de utilización en la industria energética, farmacéutica y agroalimentaria. Centrándonos en este último sector, los distintos carbohidratos presentan características tecnológicas y nutricionales que los hacen muy apropiados como ingredientes funcionales.

Entre los carbohidratos, la fibra dietética se considera como un ingrediente con funcionalidad específica. Debido a su estructura y composición, tanto la fibra soluble como la insoluble, presentan un amplio rango de atributos tecnológicos, destacando su capacidad gelificante, ya que puede ser utilizada para reemplazar compuestos lipídicos. Además se ha visto que puede beneficiar un desarrollo adecuado de la microbiota intestinal (O'Shea y col. 2012).

En este contexto, las pectinas, consideradas como fibra soluble, y los oligosacáridos derivados de pectinas, han sido identificados como prebióticos emergentes, con propiedades mejoradas, por su capacidad para modular la microbiota cuando alcanzan las porciones distales del colon, causando efectos positivos. Las fuentes más importantes de pectina son la cáscara de cítricos y la pulpa de manzana, también son

abundantes en otros subproductos agroindustriales como remolacha azucarera, cáscara de melocotón, pulpa de uva y calabaza y con menor frecuencia, las pectinas también pueden ser extraídas de subproductos industriales de patatas, girasol y cebolla (Gómez y col. 2016).

1.1 Características de la pectina

Las pectinas son una de las familias de polisacáridos estructuralmente más complejos y abundantes de las paredes celulares de las plantas superiores. Se encuentran localizadas en la laminilla media otorgando flexibilidad y fuerza mecánica a las paredes celulares. Además se ha demostrado que algunos fragmentos pécticos poseen actividades intercelulares regulatorias de mecanismos de defensa de la propia planta (Monge y col. 2007; Habibi y col. 2004; Johannes Coenen 2007).

1.1.1 Características estructurales

Las pectinas se definen como heteropolisacáridos ramificados constituidos por unidades de ácido D-galacturónico (AGal) con enlaces α -(1→4) (Johannes Coenen 2007; Gullón y col. 2013), formando una estructura lineal que consta de unas “regiones lisas” (“*smooth regions*”), ocasionalmente interrumpidas por “regiones peludas” (“*hairy regions*”) caracterizadas por ramificaciones de azúcares neutros. Según las distintas modificaciones de la cadena principal o de las cadenas laterales se han definido diversos dominios que constituyen la molécula de pectina: Homogalacturonanos (HG), Xilogalacturonanos (XGA), Rhamnogalacturonano tipo I (RG-I), Rhamnogalacturonano tipo II (RG-II) y Apiogalacturonanos (AGA), estos últimos exclusivos de plantas acuáticas (Mohnen 2008; Gullón y col. 2013; Silvia 2006) (Figura 1).

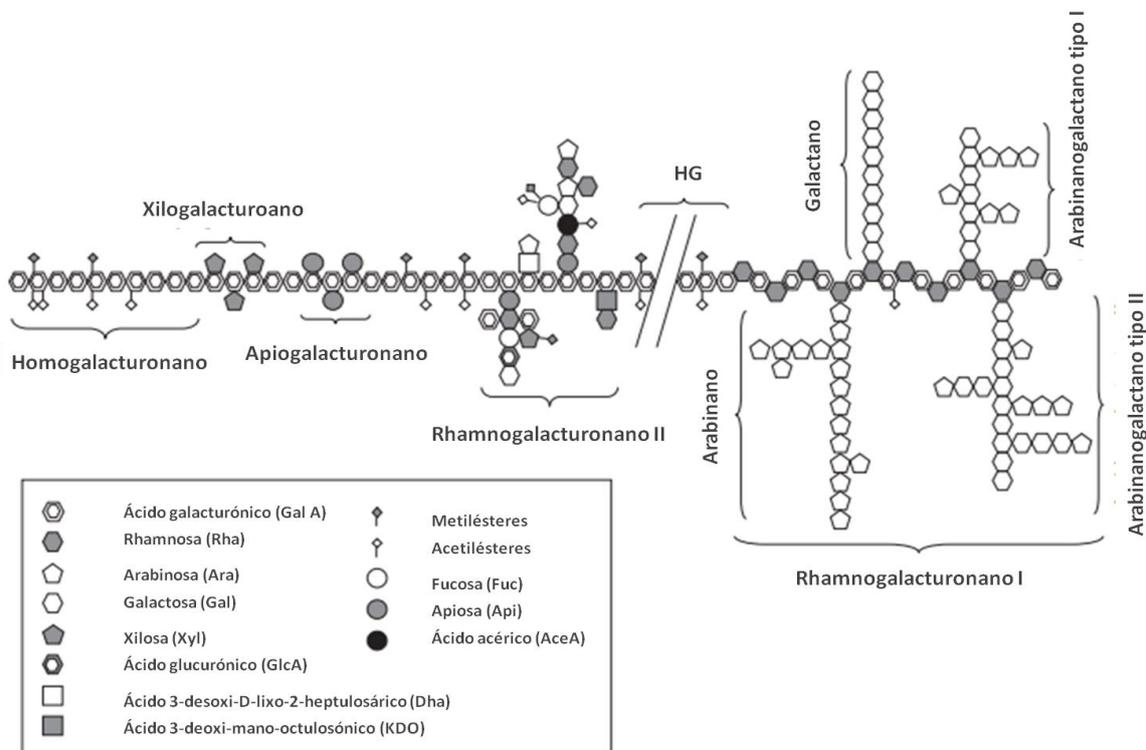


Figura 1 Estructura simplificada de la pectina (Gullón y col. 2013)

La molécula de pectina puede estar compuesta de hasta 17 monosacáridos diferentes unidos de forma covalente. La estructura más simple pero mayoritaria ($\approx 65\%$) es el HG (Galant y col. 2014), constituido por una cadena de residuos de AGal que presenta grupos carboxilos metilesterificados. También pueden ser O-acetilados en las posiciones C-2 y C-3 (Sharma y col. 2006; Ridley y col. 2001). Esta cadena lineal se encuentra covalentemente unida a RG-I y RG-II y podría estar también unida a otros dominios como XGAs (Gullón y col. 2013; Ridley y col. 2001b; Silvia 2006).

El polímero RG-I, que puede representar entre el 20-30% del total de la pectina, es una estructura compleja cuyo esqueleto contiene una unidad repetida del disacárido [α -D-AGal β -(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)-] $_n$ (Ridley y col. 2001), el cual presenta como ramificaciones, unidas al C-4 de algunos de los residuos ramnosil, otros tipos de oligosacáridos compuestos predominantemente por α -L-Arabinofuranosil (Araf) y β -D-Galactopiranosil (Gal β) (Ridley y col. 2001; Sharma y col. 2006; Chasquibol y col. 2008).

Por último, otro de los dominios importantes presentes en la pectina, aunque en menor abundancia, es el RG-II (1-8%), que consta de un esqueleto de α -D-AGal con enlaces (1 \rightarrow 4) y 4 grupos laterales con 12 tipos de azúcares diferentes, entre los cuales se encuentran fucosa, xilosa, ramnosa o galactosa y otros en menor cantidad como apiosa, ácido acérico, ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico y ácido 3-deoxi-mano-octulosónico (Galant y col. 2014; Gullón y col. 2013; Silvia 2006; Caffall y col. 2009).

1.1.2 Propiedades de las pectinas

1.1.2.1 Propiedades tecnológicas

Como en otros biopolímeros, las propiedades funcionales de las pectinas dependen en gran medida de factores intrínsecos de la molécula como su masa molecular (M_w) 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, procesamiento 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 (Einhorn-Stoll y col. 2014; Stephen y col. 2006; Muñoz 2011).

Las pectinas se pueden clasificar según su DE en pectinas de alto metoxilo (HMP) (más del 50% de grupos carboxilo están esterificados) y pectinas de bajo metoxilo (LMP) (< 50%) (Figura 2) (Seshadri y col. 2003; Galant y col. 2014). 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 (Seshadri y col. 2003; Muñoz 2011).

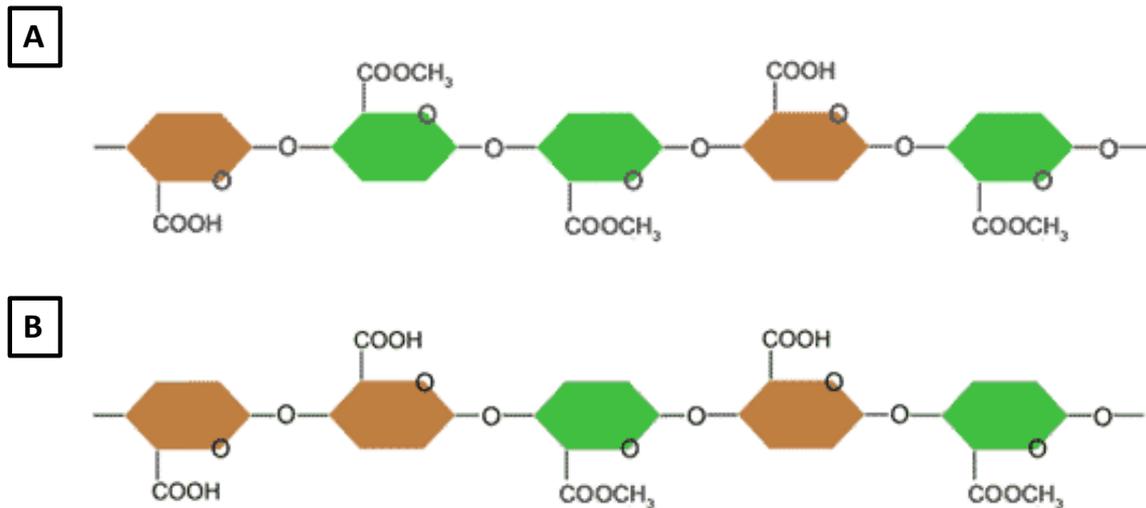


Figura 2 Estructura de las pectinas de acuerdo a su contenido de metoxilo: A) Pectinas de alto metoxilo (HMP) B) Pectinas de bajo metoxilo (LMP) (IPPA 2001)

Las HMP son capaces de formar geles en condiciones de pH entre 2,8 y 3,5 y un contenido de sólidos solubles entre 60 y 70 °Brix. La adición de azúcar ejerce un efecto deshidratante sobre los polímeros, lo que ocasiona que se favorezcan las interacciones polisacárido-polisacárido de manera hidrófoba y se forme una estructura tridimensional que rodea las moléculas de sacarosa altamente hidratadas (Muñoz 2011).

El DE de las HMP influye de manera relevante sobre sus propiedades. Para cada tipo de pectina con un grado de metoxilación concreto existe una combinación óptima de concentración de azúcar, pH y temperatura. En general, a mayor DE mayor es la temperatura de gelificación.

Las HMP se pueden subdividir en dos grupos según su temperatura de gelificación: i) “pectinas rápidas” que gelifican en menos de cinco minutos a 95 °C, presentan un DE entre 68 y 75%, tradicionalmente, se utilizan para la elaboración de mermeladas y confituras; ii) “pectinas lentas” con un DE entre el 60 y 68% que gelifican en tiempos superiores a los cinco minutos a 65 °C y se utilizan en jaleas, algunas mermeladas, conservas, panadería y en la fabricación de golosinas (Muñoz 2011; García y col. 2011).

En el caso de las LMP, el mecanismo es totalmente distinto puesto que se requiere la presencia de cationes divalentes, generalmente calcio o magnesio. Los residuos carboxilos no esterificados se encuentran negativamente cargados y puede interactuar con Ca^{2+} o Mg^{2+} formando así un gel estable con otras moléculas pécticas (modelo “caja de huevo” o “egg box”). En este caso la formación del gel ocurre por la formación de enlaces de dichos cationes con moléculas de pectina adyacentes formando una red tridimensional con los grupos carboxilo de la pectina (Muñoz 2011; Seshadri y col. 2003; Ridley y col. 2001).

La concentración de calcio necesaria es un factor importante y depende de cada tipo de pectina. En los geles de LMP suele estar en torno a las 500 ppm. Estas pectinas pueden dividirse en tres grupos: las de gelificación rápida que poseen una alta reactividad con iones de calcio y presentan un DE aproximadamente del 30%; las de gelificación media, que poseen una reactividad intermedia con iones de calcio y tienen un DE aproximada del 32%; y por último, las de gelificación lenta que poseen una reactividad media con iones de calcio y su DE aproximado es del 35%.

Las propiedades reológicas de las pectinas también dependen de la M_w , el contenido en azúcares neutros y el DE (Baier 1994; Seshadri y col. 2003; Pagán y col. 1999). En líneas generales, a bajas

concentraciones (< 0,5%), las soluciones de pectinas muestran un comportamiento Newtoniano, pero a medida que la concentración incrementa se comporta como un fluido no Newtoniano con características pseudoplásticas. Además de los mencionados, otros factores como el pH y la temperatura también influyen en la viscosidad de las pectinas (Sriamornsak 2016; Rolin 2002; Miceli-Garcia 2014).

Además de las propiedades anteriores, estudios recientes han demostrado la aplicación de la pectina como agente con actividad estabilizante en la interfase aceite-agua (emulsiones aceite en agua [O/W] o emulsiones agua en aceite [W/O]) facilitando la formación y estabilización durante y después de la emulsificación en alimentos (Figura 3) (Ngouémazong y col. 2015). Las propiedades emulsionantes de las pectinas se deben a la presencia de i) grupos acetilo (4-5%) responsable de la hidrofobicidad de la pectina por la desestabilización de los puentes de calcio, ii) de residuos de proteínas unidas covalentemente a ramificaciones presentes en la pectina o iii) a la combinación de ambos (Drusch 2007; Leroux y col. 2003).

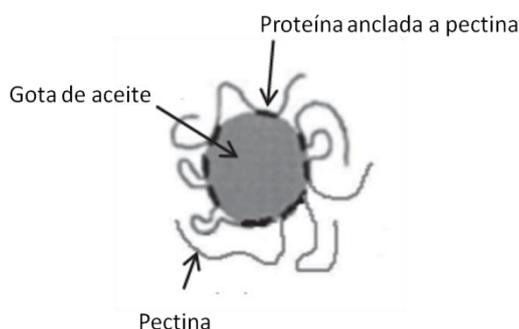


Figura 3 Modelo hipotético de la estabilización de emulsiones por pectinas (Leroux y col. 2003)

La estabilidad estérica de las emulsiones se atribuye a los dominios de RG-I, mientras que la estabilidad electrostática se debe al HG. La estabilidad de las emulsiones también se atribuye a la viscosidad de la fase acuosa de las emulsiones, particularmente en las del tipo O/W, impidiendo la movilidad de las gotas de aceite dispersas y también debido a la gelificación de las pectinas ya que se forma una red en la que las gotas de aceite quedan atrapadas y dispersadas, minimizando el fenómeno de coalescencia (Ngouémazong y col. 2015).

1.1.2.2 Propiedades biológicas

Como se ha indicado anteriormente, las pectinas presentan la propiedad de unirse a los cationes de metales pesados mediante el mecanismo de “caja de huevo” o “egg box” (Figura 4) constituyendo un agente desintoxicante y permitiendo la eliminación de metales, como mercurio, del tracto gastrointestinal (Kartel y col. 1999; Miceli-Garcia 2014). El mecanismo implica uniones de galacturonanos, donde secuencias específicas de AGal en paralelo o en cadenas adyacentes se encuentran unidas intermolecularmente a través de interacciones electrostáticas e iónicas de los grupos carboxilos, donde los iones positivos se unen a las cadenas cargadas negativamente. Son los metales tóxicos, especialmente mercurio, plomo y cadmio los que tienen una mayor afinidad siendo atrapados en la estructura y fácilmente eliminados del cuerpo por vía urinaria o fecal (Sriamornsak 2016; Eliaza y col. 2007). Para ello, las pectinas deben ser de bajo M_w y de reducida esterificación para facilitar la unión a dichos cationes (Zhang y col. 2013b; Eliaza y col. 2007).

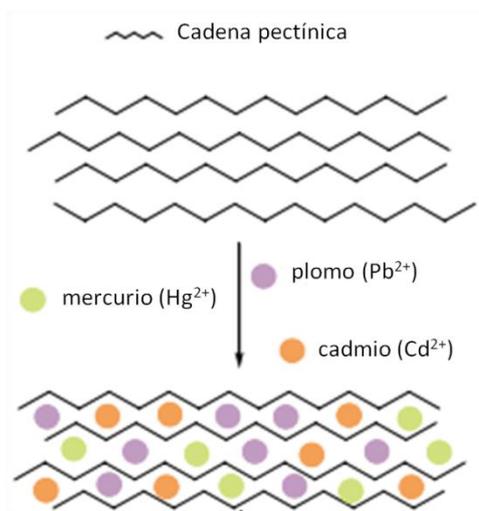


Figura 4 Estructura "egg box" (Eliaza y col. 2007)

Tal y como se ha indicado anteriormente, las pectinas son polímeros resistentes a las condiciones fisiológicas del estómago y del intestino pudiendo llegar intactos al colon, donde son degradadas por las bacterias presentes. En los últimos años, las pectinas han sido empleadas para la liberación de ingredientes alimentarios como vitaminas y proteínas. Dado que son solubles en agua su efectividad puede verse reducida, por lo que se han formulado pectinas modificadas con el objetivo de incrementar su estabilidad y alcanzar el colon para ejercer allí su función. Así, mediante la reticulación con cationes di o multivalentes, por coacervación con un polielectrolito de carga opuesta o por la mezcla con un polímero viscoso y/o sal de calcio se pueden formar complejos y reducir su propensión a ser solubilizado en un medio acuoso siendo a su vez resistentes al pH de los distintos compartimentos del sistema digestivo (Wong y col. 2011; Sinha y col. 2001; Kashappa 2005).

Una propiedad biológica prometedora de las pectinas es su efecto anticancerígeno ya que pueden inhibir el crecimiento de células tumorales induciendo la apoptosis, suprimiendo la metástasis y modulando respuestas inmunológicas (Zhang y col. 2015; Maxwell y col. 2016). En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha visto que las pectinas actúan en el bloqueo de galectina-3, suprimiendo las endotoxinas responsables de la respuesta proinflamatoria y evitando así la adhesión y migración de células tumorales y la apoptosis (Jacobasch y col. 2008).

Otra propiedad de gran interés es su efecto prebiótico incrementando el nivel de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* e inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium* y *Bacteroides*. Este estímulo del crecimiento de bacterias beneficiosas hace que asciendan los niveles de ácidos grasos de cadena corta tales como acetato, propionato y butirato, los cuales están relacionados con un gran número de efectos beneficiosos para la salud, como efectos antiinflamatorios, reducción de la incidencia de trastornos gastrointestinales, cardiovasculares e incluso efectos anticancerígenos (Gullón y col. 2011; Chen y col. 2013; Holck y col. 2014; Gullón y col. 2013).

Las pectinas pueden influir favorablemente en los niveles de colesterol en sangre. Varios estudios han demostrado que ayudan a disminuir la concentración de lipoproteínas de bajas densidad (LDL) y se ha establecido que el consumo de al menos 6 g/día de pectina es necesario para tener un efecto significativo en los niveles de colesterol (Sriamornsak 2016).

La actividad anti-adhesiva de patógenos, como actividad adicional de pectinas, se ha demostrado *in vitro* bloqueando la adherencia de *Escherichia coli* O157:H7 a las células epiteliales previniendo síntomas gastrointestinales provocados por la toxina Shiga Stx1 y Stx2 en las células colónicas HT29 (Sriamornsak 2016; Thakur y col. 1997; Gullón y col. 2011; Chen y col. 2013; Olano-Martin y col. 2003).

Por último, se ha constatado en estudios recientes que en pectinas con un contenido inferior al 75% de AGal pueden llevar a cabo una actividad inmunomoduladora. Estas pectinas se caracterizan por tener una región ramificada representada por RG-I y AGA (Popov y col. 2013). Por otro lado, se ha observado *in vitro* que las pectinas en combinación con galactooligosacáridos y fructooligosacáridos, desencadenan respuestas inmunitarias que se traduce en un incremento de los niveles de las células T-helper 1 (Th1). Esto supondría un gran avance y podría ser aplicado a fórmulas infantiles para aquellos niños con inmunodeficiencias ayudando a fortalecer el sistema inmune (Vos y col. 2007; Thakur y col. 1997).

1.2 Procedimientos de extracción y modificación de la pectina

Como se ha indicado antes, las características estructurales de la pectina y, consecuentemente, sus propiedades van a depender de numerosos factores, siendo su extracción uno de los más importantes. Según el método de extracción empleado, el HG puede predominar frente a RG-I y RG-II o viceversa. Los métodos de extracción pueden ser químicos, enzimáticos y físicos, siendo los primeros, hasta el momento, los más empleados en la industria (Gullón y col. 2013; Yapo 2009a).

1.2.1 Métodos químicos

Existen numerosos procesos de extracción química de pectinas los cuales incluyen dos pasos principales. El primero es la extracción de las paredes celulares mediante hidrólisis, llevada a cabo por ácidos orgánicos como acético, cítrico, láctico, málico, tartárico e inorgánicos como nítrico, clorhídrico, fosfórico y sulfúrico o por agentes quelantes como EDTA, oxalato amónico o hexametáfosfato sódico. La segunda etapa consiste en el aislamiento de la pectina extraída por precipitación alcohólica. Las pectinas son extraídas a elevadas temperaturas hidrolizando la protopectina mediante una serie de etapas múltiples de procesos físico-químicos, en cuyos procesos de hidrólisis y extracción intervienen diferentes factores, principalmente la temperatura, el pH y el tiempo (Methacanon y col. 2014; Masmoudi y col. 2008; Pinheiro y col. 2008; Boonrod y col. 2006; Yapo 2009a). Generalmente, la extracción mediante ácidos es la más frecuente y con la que se obtienen mayores rendimientos (Yapo 2009b), mientras que la extracción con quelantes presenta dificultades a la hora de eliminar residuos de quelatos y la extracción alcalina podría disminuir el grado de metoxilación y acetilación del polímero extraído (Levigne y col. 2002).

Según Yapo (2009a), las pectinas procedentes de manzanas y cítricos se extraen generalmente con ácidos, siendo el nítrico uno de los más empleados. Otras publicaciones del mismo autor muestran que el empleo de ácido cítrico es un buen agente de extracción en cuanto a preservar los parámetros intrínsecos de las pectinas se refiere, es decir, el grado de metoxilación, la M_w , etc. Los parámetros de extracción más adecuados son temperaturas de 60-100 °C, tiempos de 20-360 min y pH de 1,4-3. Industrialmente, la extracción mediante ácidos es ventajosa no solo por los altos rendimientos que presentan sino por el hecho de que las pectinas obtenidas presentan generalmente AGal como constituyente mayoritario. Pectinas procedentes de cítricos, manzana y remolacha azucarera son principalmente extraídas con ácidos inorgánicos, siendo los más empleados ácido clorhídrico y nítrico. Los estudios llevados a cabo por Levigne y col. (2002) mostraron que a pH 3 las pectinas tenían una composición similar a aquellas disueltas en agua,

los rendimientos fueron bajos, los extractos fueron pobres en ramnosa y la masa molar resultante de ambas extracciones fueron similares (alrededor de los 130 kDa). Sin embargo, a pH 1 se obtuvieron buenos rendimientos y la disminución del pH daba lugar a extracciones de pectinas ricas en ramnogalacturonanos (Yapo 2009b).

En el proceso de extracción no sólo influye el ácido (nitríco, sulfúrico y cítrico) empleado sino su concentración. Generalmente, incrementando la concentración del ácido de 0,01 a 0,03 M aumenta significativamente el rendimiento, con la excepción del ácido sulfúrico. Los estudios también mostraron que la variación del pH también afecta en el rendimiento. De hecho la cantidad de pectina extraída decreció a medida que el pH aumentaba de 1,8 a 2,5. A pH 2,5 con el ácido nítrico mostraron un mayor rendimiento de extracción en comparación con los ácidos cítrico y sulfúrico. A una misma concentración o pH, el rendimiento con ácido sulfúrico fue similar al ácido nítrico siendo ambos mayores que con ácido cítrico. Sin embargo, también a un mismo valor de pH la pectina extraída con ácido cítrico presenta un DE mayor que el DE con el ácido sulfúrico y nítrico (Yapo 2009a).

Otro aspecto importante en las pectinas es la relación molar AGal/Rha, normalmente >1 , indicando que el HG es predominante en la macroestructura sobre los RG. Sin embargo, la proporción HG/RG-I parece ser menor en aquellas pectinas extraídas con ácido cítrico debido a una menor degradación de las cadenas laterales. Además la M_w de la pectina extraída con ácido cítrico es mayor, lo que confirma que este ácido solubiliza la pectina de la pared vegetal provocando una menor degradación. La pectina con M_w más baja se obtiene mediante la utilización de ácido sulfúrico lo que explica que se haya podido producir una hidrólisis no solo de las cadenas laterales de RG sino también de las regiones del HG (Yapo 2009a).

1.2.2 Métodos físicos y enzimáticos

Los procesos físicos para la extracción de pectina están aún en desarrollo y sus aplicaciones en la industria son limitadas. No obstante diversas tecnologías como por microondas o mediante ultrasonidos de alta intensidad (US) están emergiendo en la actualidad. La tecnología por microondas está extensamente utilizada en la producción alimentaria y se trata de una técnica novedosa para la extracción de pectinas procedentes de cítricos (Kratchanovay col. 2004; Fishman y col. 2006; Zhongdong y col. 2006; Chen y col. 2016) y manzana (Wang y col. 2007) entre otros. Destaca por sus reducidos periodos de extracción y consumo de solventes y mayores rendimientos. En dicho proceso se fijan tres parámetros principales determinantes de la calidad de la pectina: la potencia, el tiempo de extracción y el pH del solvente (Chen y col. 2016; Kratchanova y col. 2004; Zhongdong y col. 2006).

En los tratamientos por US la energía producida mediante el fenómeno de cavitación aumenta la transferencia de masa desde la matriz sólida al solvente intensificando la separación de los compuestos de sus fuentes naturales (Freitas de Oliveira y col. 2016). Se trata de una tecnología eficiente que logra la extracción con tiempos reducidos a la vez que se minimiza el uso de disolventes tóxicos. Para ello, se han de optimizar parámetros esenciales como el tiempo, la temperatura y la intensidad de sonicación empleada para la extracción (Moorthy y col. 2017; Wang y col. 2015; Grassino y col. 2016).

Otro método de extracción es el uso de enzimas de grado alimentario. Ésta constituye una alternativa respetuosa con el medio ambiente debido a la menor producción de residuos al evitarse reacciones secundarias, originadas mediante los métodos químicos, debido a la regioselectividad de las enzimas. Al ser estas muy específicas se suelen emplear concentraciones bajas. Además, la extracción con enzimas presenta también la ventaja de emplear bajos valores de temperatura y presión. Sin embargo, desde un punto de

vista económico la utilización de enzimas resulta menos ventajosa que la extracción química. Enzimas como proteasas y celulasas son las que suelen emplearse en la separación de las pectinas de la parte insoluble de los tejidos (protopectina) mediante la despolimerización de la celulosa, hemicelulosa y proteína presente en el material vegetal (Panouillé y col. 2006; Wikiera y col. 2016).

1.3 Aplicaciones de la pectina

Con un crecimiento de, aproximadamente, 3,5% por año, el mercado mundial de pectina ha duplicado su comercio en los últimos 20 años. Su aplicación tradicional como agente gelificante y/o espesante en mermeladas y jaleas comenzó con los estudios en 1790 del químico francés Louis Nicolas Vauquelin. Sin embargo, en los últimos años han aparecido nuevas oportunidades y aplicaciones diversas en el sector agroalimentario (Figura 5), tanto aplicado a fruta fresca (productos quinta gama) como a productos derivados de frutas, productos lácteos, repostería, bebidas, incluyendo bebidas fermentadas, salsas, y cada vez es más utilizada como excipiente para fines farmacéuticos (Brejnholt 2010; Liu y col. 2003; Baier 1994).

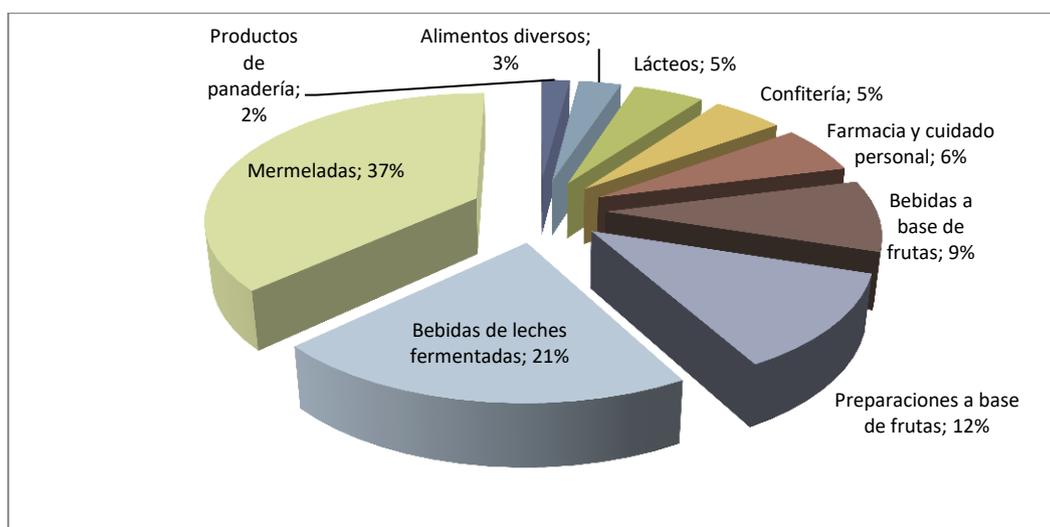


Figura 5 Distribución general de aplicaciones de la pectina (Brejnholt 2010)

1.3.1 Aplicaciones en la industria farmacéutica

El uso de pectinas en la industria farmacéutica está creciendo aunque la cantidad utilizada es mucho menor que en las aplicaciones alimentarias. Las pectinas se usan en diversas preparaciones farmacéuticas tales como excipientes, estabilizadores, películas y agentes de unión. Debido a su habilidad para unirse a metales pesados permite la excreción de estos compuestos tóxicos. De hecho, ya existen en el mercado productos nutracéuticos como PectaSol-C® a base de pectinas modificadas de cítricos que tienen como función principal la desintoxicación de metales pesados (Eliaza y col. 2007). Además, es utilizado como agente hemostático, ya que cuando se inyecta de manera intravenosa permite reducir los tiempos de coagulación siendo útil en el control de hemorragias locales (Sriamornsak 2016; Miceli-Garcia 2014).

Por otro lado, las pectinas han sido también empleadas en distintas formulaciones como portador de fármacos es decir, ingrediente para la liberación controlada de fármacos en terapias de enfermedades colónicas como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn (Wong y col. 2011; Sinha y col. 2001; Kashappa 2005).

Los sistemas de liberación controlada de fármacos deben estar diseñados para pasar intactos por el estómago e intestino y alcanzar el colon donde liberar el compuesto activo (Liu y col. 2003; Wong y col. 2011; Miceli-Garcia 2014; Wakerly y col. 1996). Las HMP, debido a que son menos solubles que las LMP, son las más interesantes para dicho uso, ya que por sus propiedades reológicas reduce la penetración de agua al compuesto activo formulado en el interior de la pectina (Vandamme y col. 2002).

1.3.2 Aplicaciones en la industria alimentaria

La pectina es uno de los estabilizadores más versátiles del mercado. Su carácter gelificante, espesante y estabilizante (Mohnen 2008; Zhang y col. 2013a; Morris y col. 2013), hacen que sea un aditivo esencial en la fabricación de numerosos alimentos. Tradicionalmente la pectina ha sido usada en la elaboración industrial y doméstica de mermeladas y jaleas de fruta, proporcionando la textura deseada. Aunque es comercializada principalmente para usos industriales, en algunos mercados europeos se vende a los consumidores como espesante (Georgiev y col. 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, un conocimiento profundo de parámetros como el M_w y el DE, en cuanto a los aspectos estructurales de la pectina se refiere, es fundamental para la obtención de geles con unas propiedades idóneas a la aplicación determinada (Novosel'skaya y col. 2000). La complejidad estructural de la pectina ofrece la posibilidad de obtener geles con funciones específicas. Sus cadenas de carbohidratos tienen estructuras muy variadas, con distintos dominios macromoleculares que determinan diferencias en las propiedades tecnológicas y bioactivas de las pectinas. Por tanto, existen diferentes campos de aplicaciones según el DE, las HMP son utilizadas para mantener la estabilización de algunos productos lácteos y LMP para prevenir la flotación y formar una distribución homogénea de piezas de frutas en yogures (Zhang y col. 2015).

El uso de la pectina actualmente es amplio destacando entre ellas (García y col. 2011):

- La elaboración de jaleas, mermeladas y postres.
- En panadería, rellenos y coberturas.
- En productos lácteos como leches acidificadas, bebidas proteicas y para espesar los yogures.

Se trata de un aditivo alimentario registrado (E-440), teniendo este heteropolisacárido que contener >65% de AGal. Dada su inocuidad la ingesta diaria recomendada (IDR) según el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) es “no específica”. Además la (Food and Drug Administration) FDA de EEUU considera las pectinas como un ingrediente seguro (GRAS) (Brejnholt 2010; Morris y col. 2013).

1.3.2.1 Utilización de la pectina como recubrimiento de frutas

Las expectativas por parte de los consumidores son cada vez mayores y demandan el consumo de alimentos nutritivos y seguros, con una mayor vida útil y con ingredientes saludables o con propiedades bioactivas. El mantenimiento de la calidad de frutas y verduras es difícil, sobre todo en aquellos productos frescos y mínimamente procesados.

Se han estudiado numerosas variantes a la refrigeración, como la utilización de fungicidas químicos, conservación en atmósferas modificadas, radiación con luz ultravioleta. En los últimos veinte años, los recubrimientos comestibles han experimentado una rápida expansión, siendo extensamente estudiados y ofreciendo numerosas ventajas, prolongando los periodos de almacenamiento, gracias al control del intercambio de gases, controlando el crecimiento microbiano, mejorando la firmeza y características

organolépticas, entre otros parámetros (Velickova y col. 2013; Gol y col. 2013; Hernández-Muñoz y col. 2006; Han y col. 2004).

Los recubrimientos comestibles se basan en el uso de diferentes materiales biológicos incluyendo polisacáridos, proteínas, lípidos o la combinación entre ellos. Los hidrocoloides utilizados para la formación de películas o *films* están compuestos por proteínas o polisacáridos como derivados de celulosa, pectinas, almidón, alginato y quitosano (Giosafatto y col. 2014). Además de en frutas y verduras, su uso se está extendiendo a productos cárnicos, quesos y pescados (Gol y col. 2013; Velickova y col. 2013). Estos recubrimientos también pueden ser un adecuado soporte para aditivos como saborizantes, antioxidantes, compuestos antimicrobianos, colorantes y compuestos bioactivos como ácidos grasos esenciales, entre otros. También pueden en sí aportar cierta funcionalidad, como en el caso de las pectinas al tratarse de un polisacárido con propiedades prebióticas, anticancerígenas, inmunomoduladora e hipocolesterolémicas, entre otras.

La formación de matrices pécticas se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas: por *casting*, extrusión, pulverización y por inmersión. El método de *casting* consiste en preparar el recubrimiento utilizando generalmente como solvente agua y un plastificador como glicerol o sorbitol; es utilizado tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. El procedimiento de extrusión es utilizado en la producción de recubrimientos comerciales de plástico, se lleva a cabo en una extrusora de doble tornillo con un troquel cilíndrico y está siendo una técnica prometedora en la elaboración de recubrimientos comestibles. La elaboración de recubrimientos mediante pulverización consiste en un proceso por el cual los polímeros son dispersados o solubilizados en una fase líquida y son pulverizados sobre la superficie del producto. Por último, en el método de inmersión se aplica la cantidad precisa de solución con el grosor deseado obteniendo una correcta uniformidad del recubrimiento sobre el producto y además, en comparación con el método por *casting*, requiere de menor tiempo de secado reduciéndolo de 24-48 h a tan solo 2 h, y es el más adecuado a realizar a escala industrial (Espitia y col. 2014).

En la actualidad los estudios siguen encaminados hacia la caracterización de nuevos films basados en hidrocoloides y hacia la determinación de la capacidad que éstos poseen para la conservación y prolongación de la vida útil de los alimentos. En la literatura se puede encontrar una amplia gama de aplicaciones en el desarrollo de recubrimientos en alimentos a base de pectinas en combinación con otros compuestos: polisacáridos como alginato (Guerreiro y col. 2015b), alginato y aceites esenciales como citral y eugenol (Guerreiro y col. 2015a; Ayala-Zavala y col. 2013), con salicilato sódico (Gorrasi y col. 2016), con proteínas como la faseolina (Giosafatto y col. 2014), con soja (Di Pierro y col. 2005), con té verde (Kang y col. 2007). Hasta nuestro conocimiento, la utilización sólo de pectina no se ha ensayado como recubrimiento comestible en fresas.

Tabla 1 Tabla-resumen de las propiedades más destacadas de las pectinas enfocadas hacia su uso en la industria farmacéutica y alimentaria

Propiedad	Función	Aplicación	Referencias
Desintoxicante	Eliminación de metales pesados	Industria farmacéutica, medicina	Kartel y col. 1999; Miceli-Garcia 2014; Eliaza y col. 2007; Zhang y col. 2013
Drug carrier (portador de fármacos)	Liberación controlada de fármacos en los órganos de interés	Industria farmacéutica	Wong y col. 2011; Sinha y col. 2001; Kashappa 2005; Vandamme y col. 2002; Liu y col. 2003; Wong y col. 2011; Miceli-Garcia y col. 2014; Wakerly y col. 1996
Anticancerígena	Inhibición del crecimiento de células tumorales, induce la apoptosis, suprime la metástasis y modula respuestas inmunológicas	Industria farmacéutica	Zhang y col. 2015; Maxwell y col. 2016; Jacobasch y col. 2008
Hipocolesterolémica	Disminución de la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL)	Industria farmacéutica	Sriamornsak y col. 2016
Prebiótico	Provoca la formación de AGCC y el crecimiento de <i>Bifidobacterias</i> y <i>Lactobacillus</i> y disminuye el desarrollo de <i>Clostridium</i> y <i>Bacteriodes</i>	Industria farmacéutica, industria alimentaria	Gullón y col. 2011; Chen y col. 2013; Holck y col. 2014; Gullón y col. 2013
Antiadhesión de patógenos	Bloquea la adherencia de <i>Echerichia coli</i> O157:H7 previniendo la formación de Stx1 y Stx2 en células colónicas HT29	Industria farmacéutica	Sriamornsak 2016; Thakur y col. 1997; Gullón y col. 2011; Chen y col. 2013; Olano-Martin y col. 2003
Inmunomoduladora	Incrementa niveles Th1 desencadenando respuestas inmunitarias	Industria farmacéutica	Vos y col. 2007; Thakur y col. 1997
Gelificante	Consistencia y estabilidad en jaleas, mermeladas, yogures, bebidas, postres.	Industria alimentaria	Mohnen 2008; Zhang y col. 2013; Morris y col. 2013; Thakur y col. 1997; García y col. 2011
Estabilizante			
Espesante			
Recubrimientos comestibles	Protección frente a agresiones externas mejorando las propiedades organolépticas e incrementando la vida útil de frutas y verduras	Industria alimentaria	Giosafatto y col. 2014; Miranda y col. 2003

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

En la sociedad actual los excedentes procedentes de la industria hortofrutícola están suponiendo un serio problema ambiental; por otra parte, se produce una mayor incidencia de enfermedades causadas por los nuevos hábitos alimentarios. Estos dos hechos constituyen un reto tanto para la industria alimentaria como para la investigación. Por ello, una de las tendencias actuales se centra en el aprovechamiento de los subproductos industriales de forma que se puedan revalorizar, junto con la materia prima, y así disponer de ingredientes funcionales que contribuyan a un estilo de vida más saludable.

Dentro del sector hortofrutícola los subproductos procedentes de cítricos son unos de los más valorados por su elevado contenido en componentes bioactivos, entre los que se encuentran las pectinas y derivados. Estos compuestos pueden ejercer un efecto beneficioso a nivel gastrointestinal y sistémico, además de poseer excelentes propiedades tecnológicas, lo que les sitúan como ingredientes de elección en numerosas formulaciones farmacéuticas y, especialmente en productos alimentarios, siendo su utilización como recubrimientos una de sus aplicaciones más recientes. Como es sabido, todas estas propiedades se encuentran estrechamente relacionadas con su estructura. Por todo ello, es preciso disponer de pectinas industriales perfectamente caracterizadas para poder elegir las mejores aplicaciones y así obtener alimentos que satisfagan a los consumidores actuales.

Por tanto, en base a los antecedentes expuestos, el presente trabajo tiene como objetivos principales **la caracterización proximal y estructural de pectinas elaboradas industrialmente procedentes de subproductos de cítricos (lima y limón) y su evaluación reológica con el fin de ser empleadas como recubrimientos durante la conservación de fresas frescas.**

Para alcanzar los objetivos propuestos se ha abordado el siguiente plan de trabajo:

- Caracterización físico-química de las pectinas industriales.
- Caracterización estructural de las pectinas proporcionadas por la industria:
 - Evaluación de la composición monomérica mediante GC-FID tras hidrólisis ácida.
 - Estimación de la distribución de la masa molecular, mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC) acoplado a un Detector Evaporativo de Dispersión de luz (ELSD), previa puesta a punto del método.
 - Estimación del grado de esterificación por FT-IR
- Estudio de las propiedades térmicas y reológicas de las pectinas industriales.
- Aplicación como recubrimiento durante la conservación de fresas.

A continuación se presenta un plan de trabajo esquematizado (Figura 6) para ofrecer una visión general del estudio experimental llevado a cabo.



Caracterización de las pectinas

Aplicación en un alimento

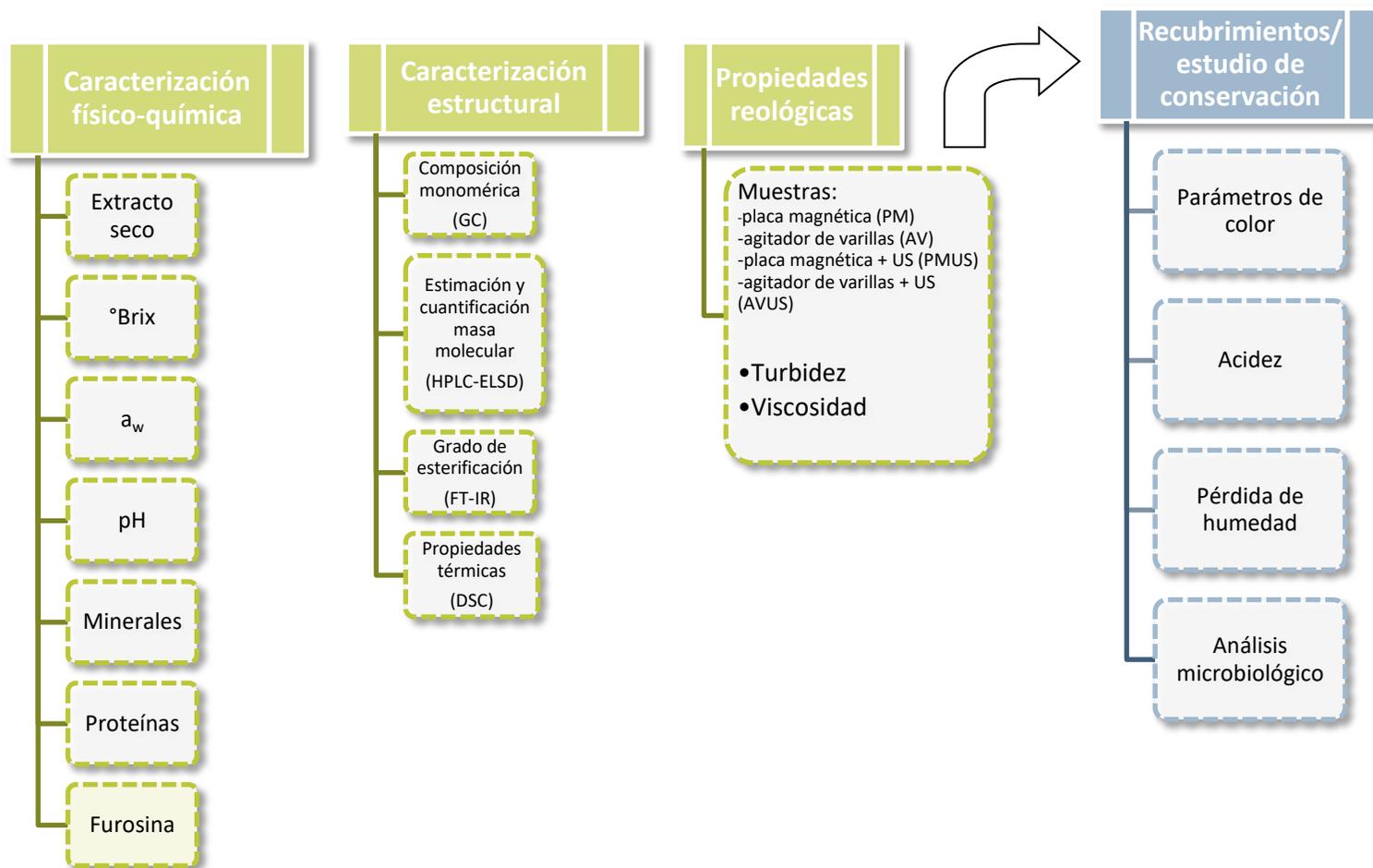


Figura 6 Esquema general del plan de trabajo llevado a cabo

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y muestras

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado los reactivos requeridos para la preparación del método Bradford (Bio-Rad Laboratorios GmbH, Múnich, Alemania), ácido trifluoroacético (TFA), patrones de D-arabinosa, D-xilosa, L-ramnosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, ácido galacturónico (AGal), lactosa, rafinosa y β -fenil-glucósido (Sigma-Aldrich) y pululanos de masa molecular (M_w) conocida (0,342-805 kDa) (Pullulan Standart Set) proporcionados por Fluka. El agua utilizada para preparar soluciones y fases móviles era de calidad ultra—pura (18,2 M Ω cm) y fue producida mediante un sistema Milli-Q Synthesis A10 system de Millipore (Billerica, MA, USA).

3.1.1 Pectinas industriales

Las muestras empleadas de pectinas industriales fueron suministradas por CEAMSA (Compañía Española de Algas Marinas S.A., Portiño, España) cuyo proceso de obtención se resume a continuación (Figura 7):

- **Recepción** de la cáscara, muestreo representativo, análisis y aprobación de calidad
- Peso de la cáscara y **cocción** en medio ácido
- **Filtración** con celulosa o filtración **gruesa**
- **Filtración** con perlita o filtración **fin**a
- Proceso de **intercambio iónico** mediante resinas sódicas
- **Concentración** mediante ultrafiltración y otro sistema de concentración
- **Neutralización**
- **Precipitación** con alcohol isopropílico
- **Prensado**
- **Secado**
- **Molienda y tamizado** en distintos tamaños de partícula
- **Mezclado con sales y azúcares de estandarización** y ensacado
- Control de calidad del lote y expedición.

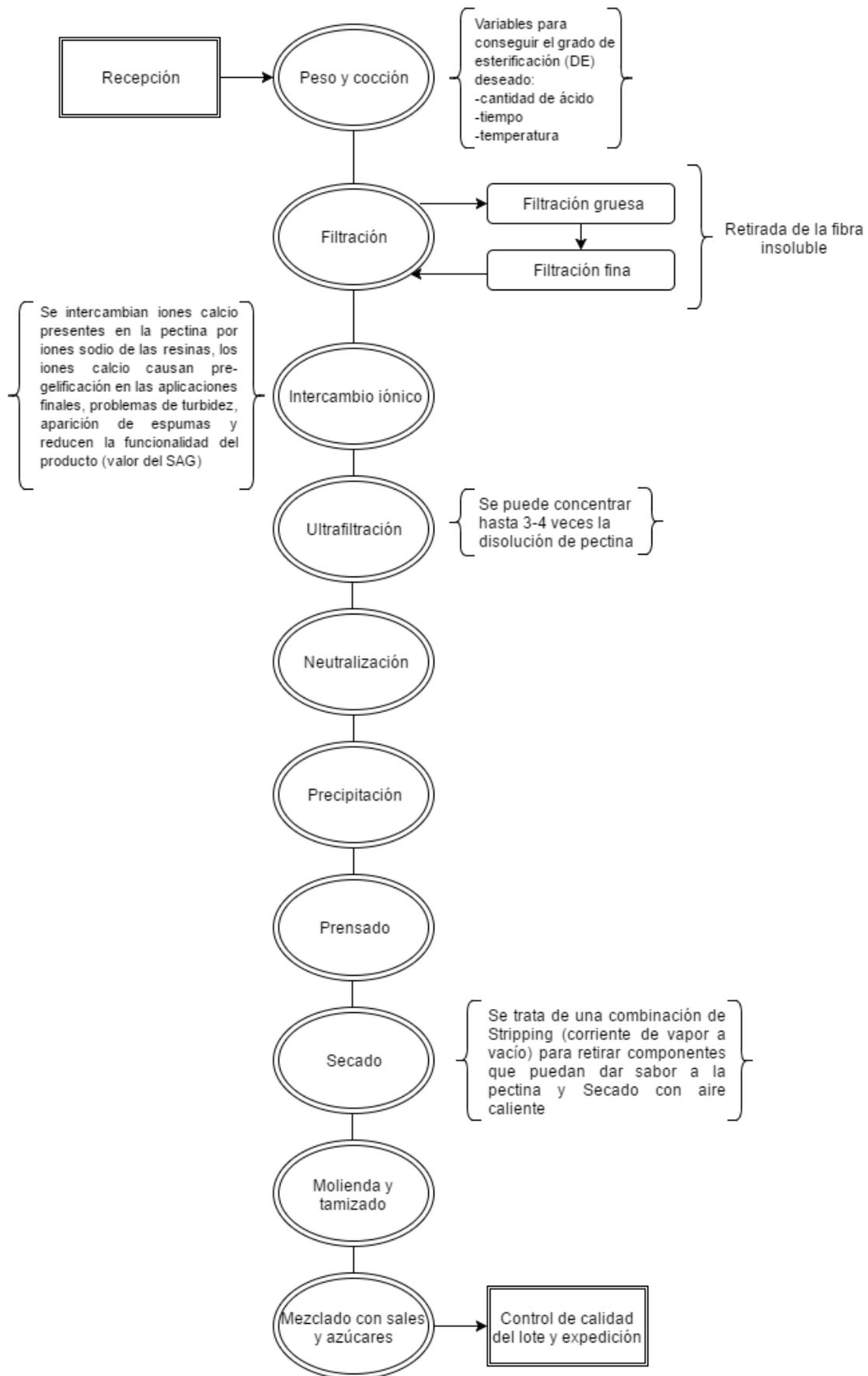


Figura 7 Esquema del proceso de obtención de las pectinas industriales

Las muestras a utilizar proceden de cáscaras de lima y limón. Según las especificaciones la pectina 4400 está compuesta en su totalidad por pectina y la 4710 incluye azúcares. En base a la diferente composición las aplicaciones indicadas en el informe proporcionado eran: la 4710 para mermeladas y la 4400 para productos de confitería. El certificado de análisis, facilitado por la empresa se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 Certificado de análisis de pectinas industriales procedentes de CEAMSA

Análisis	Pectina-4400	Pectina-4710
Composición	Pectina (E-440)	Pectina (E-440), azúcares
pH	3,10	3,00
DE (%)	58,00	71,00
SAG ¹	208,00	154,00
Recuento total de placa (ufc/g)	< 5000,00	< 5000,00
Mohos y levaduras (ufc/g)	< 300	< 300
<i>E. coli</i> (en 5g)	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella</i> (en 25g)	Ausencia	Ausencia
Humedad (%)	< 12,00	< 12,00
Metales pesados (ppm)	< 20,00	< 20,00
As (ppm)	< 3,00	< 3,00
Pb (ppm)	< 5,00	< 5,00
Hg (ppm)	< 1,00	< 1,00
Cd (ppm)	< 1,00	< 1,00

¹Grados SAG: mide el poder gelificante (Committee for Pectin Standardisation, 1959).

3.2 Métodos analíticos para la caracterización global de las pectinas

Las determinaciones de pH se realizaron a 25 °C utilizando un pH-metro Mettler-Toledo equipado con un electrodo de referencia Mettler-Toledo, InLab® 420. Se preparó una disolución al 1% (p/v) con H₂O Milli-Q y se midió por duplicado.

El extracto seco se determinó en un horno (Thermo Scientific Heraeus) a 102 °C, partiendo de 0,2 g de muestra hasta llegar a peso constante transcurridos 3 días. Esta determinación se llevó a cabo por triplicado.

La actividad de agua (a_w) se determinó en un aparato Novasina (Aw Sprint Th 500) con control de temperatura. Previamente, se realizó una calibración del equipo con patrones de a_w controlada, correspondientes a disoluciones acuosas saturadas de distintas sales inorgánicas (LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NaCl, BaCl₂ y K₂Cr₂O₇). Una fracción de muestra se colocó en cápsulas completando 2/3 de su capacidad y se introdujo en el interior de la celda. La muestra se analizó por duplicado a 25 °C de temperatura.

Los °Brix se determinaron por duplicado en las pectinas industriales preparadas al 1% (p/v) en agua, mediante un refractómetro digital Refracto 30PX/30GS (Mettler Toledo).

Se llevó a cabo un análisis semicuantitativo de la composición de minerales por ICP-MS y un análisis cuantitativo de los elementos más importantes (Na, K, Ca y Mg), utilizando un equipo Elan 6000 Perkin-Elmer Sciex del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la UAM.

El análisis del contenido en proteínas se realizó por colorimetría mediante el método Bradford que utiliza un colorante hidrofóbico, azul de Coomassie (BioRad Ptoein Assay Dye Reagent) cuyas disoluciones

acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en un entorno hidrofóbico al unirse a la proteína, origina un color azul intenso cuya absorbancia se mide a 595 nm. Se empleó seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón en un intervalo de 0,8 a 0,016 mg/mL (Bradford, 1976). La determinación se realiza tomando 150 μ L de agua, patrón o muestra y se añaden 600 μ L de reactivo Bradford. La reacción se desarrolla durante 5 min en oscuridad (ya que este reactivo se degrada con la luz). El color de la reacción permanece estable 1 h y la lectura se lleva a cabo en una placa multipocillos a 595 nm (Lector KC Junior, Biotek).

La determinación de furosina se realizó siguiendo un método de par iónico de RP-HPLC puesto a punto en nuestro laboratorio, utilizando una columna C8 y un detector UV a una longitud de onda de 280 nm (Gamboa-Santos y col. 2013). Previamente 0,25 g de pectina se hidrolizaron con 4 mL de HCl 8 M durante 23 h a 110 °C. La muestra se purificó utilizando Sep-Pack C₁₈.

3.3 Métodos analíticos para la caracterización estructural de las pectinas

3.3.1 Análisis de la composición monomérica mediante cromatografía de gases (GC-FID)

La composición monomérica de las pectinas, es decir los azúcares neutros individuales y el AGal, fueron determinados mediante GC-FID. La hidrólisis ácida previa se realizó según el trabajo de Wikiera y col. (2015) con modificaciones. Las muestras de pectinas se trataron con TFA 2 M a una concentración de 20 mg de pectina por mL de ácido, se hizo pasar una corriente de N₂ para evitar la oxidación de los compuestos liberados durante la hidrólisis y se mantuvieron durante 3 a 5 h en una estufa a 110 °C (Garna y col. 2006).

Previamente a la inyección, fue necesario llevar a cabo una modificación química de las muestras mediante derivatización. Con los distintos métodos de derivatización se sustituyen los grupos polares de los carbohidratos por otros apolares, con el objetivo de disminuir la temperatura de evaporación de los compuestos y, por tanto, posibilitar su detección por GC (Ruiz-Matute y col. 2011).

En este caso se prepararon los trimetilsilil derivados de las oximas de los carbohidratos según el método de Ruiz-Matute y col. (2011) con modificaciones, cuyo procedimiento consiste en dos pasos: oximación y sililación. Se tomaron 500 μ L (10 mg de pectina) de las muestras hidrolizadas y se rotaevaporaron, a 40 °C, hasta eliminar el ácido, para evitar que el patrón interno, añadido a continuación (400 μ L de β -fenil-glucósido, 0,5 mg/mL), pueda hidrolizarse, y se vuelve a evaporar hasta sequedad. Para la formación de oximas, las muestras fueron disueltas en piridina con 2,5% de cloruro de hidroxilamina y se mantuvieron durante 30 minutos a 70 °C agitando a la mitad y al final de la reacción. Para la reacción de sililación, se añadieron 250 μ L de hezametilidisilazano (HMDS) y 25 μ L de TFA y la mezcla se dejó reaccionar durante otros 30 minutos a 50 °C. Por último, las muestras se centrifugarán durante 2 minutos a 10000 rpm recogiendo el sobrenadante para su posterior inyección.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases (GC7890A) equipado con un detector de ionización de llama (FID), un inyector automático 7693A (Agilent Technologies Ing., Palo Alto, CA) y una columna capilar de sílice fundida DB-5HT (15 m x 0,32 mm x 0,10 μ m) (J&W Scientific, Folsom, California, USA). La temperatura inicial del horno fue 150 °C con la siguiente rampa de temperatura: incremento de 1 °C/min hasta 165 °C, incremento de 10 °C/min hasta 200 °C y por último una rampa de 50 °C/min hasta 350 °C manteniéndose a esta temperatura durante 2 minutos. La temperatura del inyector y del detector fue de

280 °C y 385 °C, respectivamente. La inyección de la muestra se realizó en modo Split 1:30. El gas portador utilizado fue N₂ a un flujo de 1 mL/min.

El análisis cuantitativo se realizó mediante el método del patrón interno calculando los factores de respuesta de los distintos monosacáridos presentes (D-arabinosa, D-xilosa, L-ramnosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, AGal) previamente inyectados a concentraciones conocidas (de 0,01 a 2 mg/mL) respecto al β-fenil-glucósido. El análisis de las muestras se realizó por duplicado. El tratamiento de resultados se realizó con el software Agilent ChemStation en todos los casos.

3.3.2 Análisis de la fracción de carbohidratos de bajo peso molecular por cromatografía de gases (GC-FID)

Siguiendo un método cromatográfico semejante al anterior se analizó por GC-FID la fracción de carbohidratos de bajo peso molecular (con grado de polimerización, GP, inferior a 6) preparando igualmente los trimetilsilil derivados de las oximas. En este caso se tomaron 5 mg de pectina a la que se añadió 400 µL de β-fenil-glucósido (0,5 mg/mL) y se evaporó hasta sequedad. Se derivatizó la muestra de igual forma y se analizó en el mismo sistema cromatográfico, cambiando únicamente el programa de temperaturas del horno. La temperatura inicial del horno fue 150 °C con la siguiente rampa de temperatura: incremento de 1 °C/min hasta 165 °C, incremento de 10 °C/min hasta 380 °C manteniéndose a esta temperatura durante 2 min.

3.3.3 Estimación de la masa molecular mediante cromatografía de líquidos con detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD)

El estudio de la distribución de M_w de los carbohidratos presentes en las muestras de pectinas industriales se realizó mediante HPLC-SEC en un equipo Agilent 1200 Infinity LC System 1260 acoplado a un Detector Evaporativo de Dispersión de Luz (ELSD, Agilent 1260) utilizando dos columnas en serie, una TSKgel G5000PW_{XL} (7,8 mm x 30 cm) y una columna TSKgel G2500PW_{XL} (6,0 mm x 4,0 cm) con un tamaño de partícula de 10 y 6 µm respectivamente, procedentes de Tosoh Bioscience (Stuttgart, Alemania). Como fase móvil se utilizó acetato amónico (C₂H₃O₂NH₄) 0,01 M con un flujo de 0,5 mL/min y el análisis de resultados se llevó a cabo utilizando el software integrado Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Boeblingen, Alemania).

El ELSD es un detector semi-universal cuyo principio fundamental se basa en tres procesos sucesivos: nebulización del eluyente que sale de la columna cromatográfica mediante un flujo de gas de aire o nitrógeno, la evaporación de la fase móvil y la detección mediante ELSD de los analitos semi y no volátiles (Figura 8). La respuesta del detector depende de la concentración del analito y no de la estructura química de la molécula (Condezo-Hoyos y col. 2015; Terol 2012).

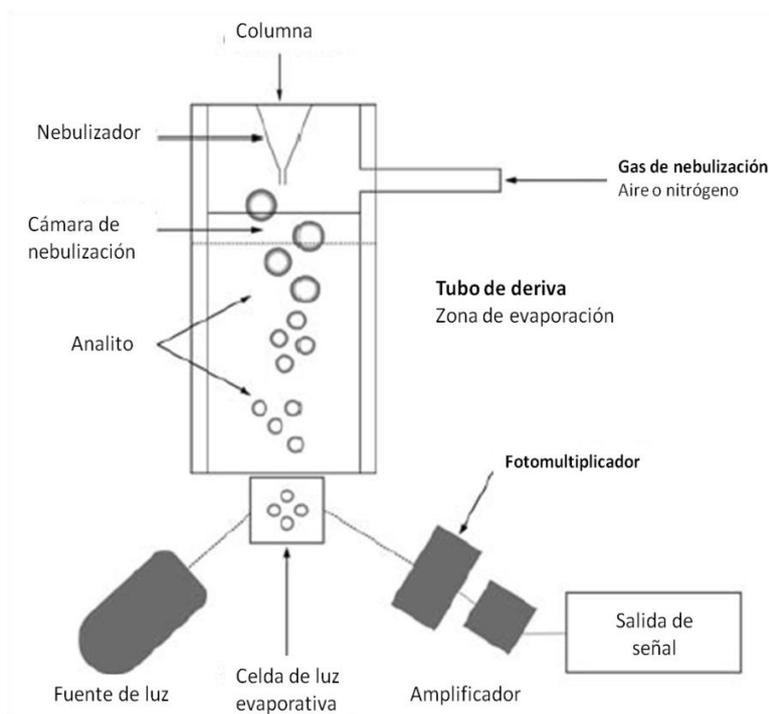


Figura 8 Detector ELSD acoplado a HPLC

Este detector presenta una respuesta no lineal. Sin embargo, permite llevar a cabo la detección mediante un gradiente de elución reduciendo así los tiempos de análisis o mejorando la resolución. Además, es notablemente más sensible que el RID, permitiendo una buena resolución en sus análisis (Dvořáčková y col. 2014; López Hernández y col. 1998; Condezo-Hoyos y col. 2015).

3.3.3.1 Diseño experimental para la optimización de los parámetros del ELSD

Para optimizar los parámetros de funcionamiento del detector ELSD se realizó un diseño experimental centrado en las caras con el *software Statgraphics Centurion XVI*. Las tres variables independientes fueron la temperatura de nebulización (65-85 °C), la temperatura de evaporación (75-95 °C) y el flujo de aire (1,0-1,6 mL/min). En los distintos ensayos del diseño se inyectan un patrón de pululano de M_w 0,3 kDa a una concentración de 50 mg/L. Para determinar el volumen óptimo de inyección se utilizaron distintos volúmenes (20-100 μ L) de isopropanol y se determinó que el óptimo era de 50 μ L. Todas las muestras y patrones eran preparadas a la concentración adecuada en agua milli-Q y filtrados mediante filtros de PVDF de 0,20 μ m de tamaño de poro.

3.3.3.2 Puesta a punto del método cromatográfico para la estimación de la masa molecular

Una vez se seleccionaron los parámetros del ELSD, se procedió a la optimización del método cromatográfico para la estimación de la M_w y la determinación de la concentración de los distintos compuestos. Para ello, las soluciones de patrones de pululanos de M_w conocida (0,342-805 kDa) se inyectaron a diferentes concentraciones (10-2500 mg/L) en las condiciones óptimas establecidas para el ELSD y se realizó el calibrado. La recta de calibrado para la estimación de la M_w se construyó a partir de la representación del $\log M_w$ frente al volumen de elución.

La recta de calibrado para la determinación de la concentración de los distintos compuestos se construyó a partir de la representación de la respuesta del detector ($mV*s$) frente a la concentración (mg/L)

de cada pululano. Dada la respuesta exponencial de este detector se realizó una representación logarítmica de ambos parámetros (respuesta y concentración), consiguiéndose así una relación lineal.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon basándose en la relación señal/ruido. El LOD se calculó como la concentración correspondiente al triple del área del ruido de la línea base en una zona sin picos y con una anchura semejante a la anchura del pico del patrón más próximo; mientras que el LOQ se calculó como diez veces dicha área.

El estudio de la repetitividad o precisión analítica se llevó a cabo mediante repetidas inyecciones en distintos días de una pectina de cítricos (n=5) preparada a una concentración de 2500 mg/L en agua y se determinó calculando la desviación estándar relativa (%) correspondiente a la media de las 5 determinaciones. La repetitividad del método se realizó inyectando el mismo día 4 preparaciones de una pectina de cítricos preparada a una concentración de 1200 mg/L en agua y se determinó calculando la desviación estándar relativa (%) correspondiente a la media de las 4 alícuotas preparadas.

3.3.4 Estimación del grado de esterificación (DE) mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La determinación del grado de esterificación (DE) de las pectinas industriales se realizó en el SIdI, utilizando un espectrómetro FTIR Bruker IFS66v. Se pesaron 0,5 mg de cada pectina y se preparó una pastilla de KBr. Las medidas en transmisión tuvieron un intervalo espectral de 7000-550 cm^{-1} (IR medio), una resolución de 4 cm^{-1} y una apertura de 1,0 mm.

3.3.5 Análisis térmico por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se llevó a cabo en el SIdI un análisis por Calorimetría de barrido diferencial (DSC, *Differential scanning calorimetric*) mediante un Calorímetro DSC Q100 (TA Instruments).

Según el método descrito por Wang y col. (2014), se pesaron entre 10-50 mg de cada pectina, se pusieron sobre un portamuestras de aluminio y fueron inmediatamente selladas. El crisol se fue calentando a una temperatura entre 40 y 300 °C a una velocidad de 10 °C/min con nitrógeno como gas de purga.

3.4 Propiedades reológicas

3.4.1 Preparación de soluciones de pectinas

Se prepararon distintas soluciones de pectinas al 1, 3, 5 y 8% (p/v) mediante dos formas diferentes de agitación, con placa magnética y con agitador de varillas. Se llevó a cabo a una temperatura controlada (50 °C) durante 20 minutos, tiempo suficiente para conseguir su completa homogeneización. Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.4.1.1 Tratamientos con ultrasonidos de potencia

Tras elegir la concentración óptima (3%) según una apreciación visual, cada muestra se dividió en 2 partes y una de ellas se trató mediante un equipo de US (Branson Digital Sonifier 450 W potencia máxima) provisto de una sonda de 12,7 mm de diámetro (Biogen Científica S.L.), un sensor de temperatura integrado y con una frecuencia de operación de 20 kHz. Según las condiciones previamente estudiadas en nuestro laboratorio, las óptimas seleccionadas fueron una amplitud del 30 y 50%, en modo intermitente (2 s on/ 5 s

off), durante 30 minutos. La temperatura fue controlada con un baño de agua-hielo para que no aumentara por encima de los 50 °C (Tabla 3).

Tabla 3 Códigos empleados para las distintas muestras preparadas

Pectina	Preparación	Sin US	Con US (2 s on/ 5 s off)
4400	Agitador de varillas	4400 AV	4400 AVUS
	Placa magnética	4400 PM	4400 PMUS
4710	Agitador de varillas	4710 AV	4710 AVUS
	Placa magnética	4710 PM	4710 PMUS

3.4.2 Medida de la turbidez de las soluciones de pectina

La turbidez de las soluciones anteriormente preparadas al 3%, tanto de pectinas tratadas mediante US como las no tratadas, se determinó con un espectrofotómetro provisto de un lector de placas (Lector KcJunior Biotek). La longitud de onda seleccionada para el análisis fue de 480 nm, cuyo valor de absorbancia está relacionado con la claridad de los geles (Seshadri y col. 2003).

3.4.3 Determinación de las propiedades reológicas de las soluciones de pectina

Las propiedades reológicas de las muestras de pectinas industriales se determinaron en un reómetro rotacional Haake MARS (Haake, Thermo, USA) a temperatura constante (25 °C) regulada por un baño termostático. La medida se llevó a cabo mediante un viscosímetro de cono-placa (DC60/2°, Haake, Germany).

Se llevó a cabo el estudio de la influencia de la velocidad y el tiempo de cizalla en la viscosidad. Los ensayos se realizaron con velocidad de cizalla controlada (*Controlled rate*, CR) hasta un valor máximo de 1000 s^{-1} , siguiendo dos tipos de curvas de flujo, que se diferencian según la duración de las tres fases. En la primera curva (Figura 9-A), en la primera fase la velocidad subía de 0- 1000 s^{-1} en 300 s, se mantenía durante 60 s en la segunda fase y en la tercera bajaba de 1000 - 0 s^{-1} en 300 s. En el segundo programa (Figura 1B), la primera fase iba de 0- 1000 s^{-1} durante 30 s, se mantenía durante 600 s y en la fase final bajaba a 0 en 30 s, como se puede observar en la siguiente figura (Figura 9-B).

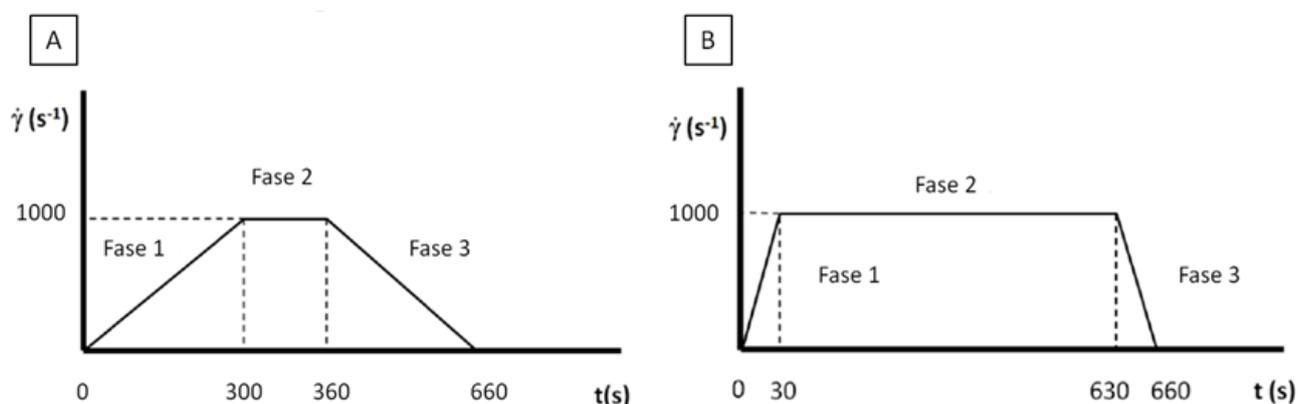


Figura 9 Condiciones de tiempo y velocidad de cizalla para los dos tipos de curvas de flujo: A) 0- 1000 s^{-1} (300 s) / 1000 s^{-1} (60 s) / 1000 - 0 s^{-1} (300 s) B) curva de flujo a 0- 1000 s^{-1} (30 s) / 1000 s^{-1} (600 s) / 1000 - 0 s^{-1} (30 s)

3.5 Ensayos de conservación de fresas recubiertas con pectina

Se emplearon fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.) procedentes de Palos de la Frontera (Huelva) como materia prima para estudiar el efecto de distintos tipos de recubrimiento comestible. Se seleccionaron 72 bayas sin daños fisiológicos, similar calibre y estado de maduración.

Para elaborar los recubrimientos comestibles se prepararon geles al 3% con los dos tipos de pectinas 4400 y 4710 y i) agitación en placa (4400 PM, 4710 PM), ii) agitación en placa y tratamiento de US (4400 PMUS, 4710 PMUS), iii) agitador de varillas (4400 AV, 4710 AV) y iv) agitador de varillas y tratamiento de US (4400 AVUS, 4710 AVUS), tal y como se ha visto en el apartado *Preparación de soluciones de pectinas* (Tabla 3), y se reservó un grupo de fresas sin ningún tipo de recubrimiento como muestras control.

3.5.1 Recubrimiento de fresas

Antes de comenzar a recubrir las fresas con los geles, los frutos se lavaron y secaron a temperatura ambiente. Tras ello, fueron recubiertas mediante inmersión con cada solución de pectina tratada durante 2 minutos y el exceso se dejó gotear durante 30 segundos (Guerreiro y col. 2015) A continuación, las muestras fueron secadas por convección en un prototipo de secador de bandejas (SBANC, Edibon Technical Teaching Units, España) con corriente de aire (219 m/s) a temperatura ambiente (Gamboa y col. 2013). Las muestras recubiertas y controles fueron envasadas en cajas de poliestireno y almacenadas en condiciones de refrigeración a 4 °C durante un periodo de 5 días.

3.5.2 Evaluación de la calidad de las fresas con recubrimiento de pectina

A lo largo del periodo de conservación se llevaron a cabo comparativas de diferentes parámetros de calidad y posible grado de deterioro con toma de muestra los días 0, 3 y 5. Los parámetros analizados fueron: el color, el porcentaje de pérdida de humedad, la acidez y el recuento de mohos y levaduras.

Para la determinación de la acidez se preparó un puré de fresa triturada añadiendo el mismo peso en agua destilada.

Las pérdidas de peso se determinaron por gravimetría. Se tomó el peso inicial de la fresa recubierta (P_i) y el peso del fruto al final (P_f) de su periodo de almacenamiento y los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso (% PP) mediante la siguiente ecuación (Restrepo y col. 2010):

$$\%PP = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

Para la determinación del color se practicaron tres mediciones a cada fruta utilizando el colorímetro modelo CM-508i (Minota Co. LTD, Japón), obteniendo las coordenadas de color L^* (indicador de luminosidad; 0= negro y 100= blanco), a^* (cromaticidad (-) verde a (+) rojo) y b^* (cromaticidad (-) azul a (+) amarillo), a partir de las cuales se calculó el *Chroma* [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$], el tono *hue angle*, [$h^\circ = (\arctan b^*/a^*)$] y las diferencias de color totales (ΔE^*) mediante la siguiente ecuación (Holzwarth y col. 2013):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* representan las diferencias entre los parámetros de color de los frutos recubiertos y de los frutos control, tomados como referencia el día cero (inicio del almacenamiento).

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis microbiológico se llevó a cabo un control de crecimiento de mohos y levaduras en los días 0, 3 y 5. Para ello, se utilizaron 1,5 g de fresa con 27 mL de agua peptonada (peptona estéril, 2,55%) y fueron homogeneizados en un *stomacher* durante 1 minuto (230 rpm), se filtró y posteriormente se diluyó de nuevo con agua peptonada para el recuento de mohos y levaduras. El recuento se determinó sembrando las diluciones adecuadas en agar triptona-sulfito-cicloserina (TSC) y se incubó a 25 ± 1 C durante 5 días.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la pectina

4.1.1 Caracterización físico-química

Inicialmente se realizó una caracterización físico-química de las pectinas industriales. Para ello, se determinó el extracto seco, la a_w , el pH, los °Brix y el contenido en minerales, proteína y furosina. En la Tabla 4 se recogen los resultados obtenidos. Los datos de extracto seco, a_w y pH garantizarían la estabilidad microbiológica de las muestras, tal y como indican los resultados proporcionados por la empresa (Las muestras a utilizar proceden de cáscaras de lima y limón. Según las especificaciones la pectina 4400 está compuesta en su totalidad por pectina y la 4710 incluye azúcares. En base a la diferente composición las aplicaciones indicadas en el informe proporcionado eran: la 4710 para mermeladas y la 4400 para productos de confitería. El certificado de análisis, facilitado por la empresa se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 de *Materiales y Métodos*). A pesar de tener distinta composición, ambas pectinas presentaron valores similares de pH, °Brix y proteína, en concordancia con la literatura (Georgiev y col. 2012; Chasquibol y col. 2008)

Tabla 4 Valores obtenidos de pH, a_w , °Brix y extracto seco para las pectinas de cítricos 4400 y 4710

Parámetros	4400	4710
Extracto seco (%)	90,2 ± 0,6	91,3 ± 0,2
a_w	0,22 ± 0,001	0,20 ± 0,003
pH	3,04 ± 0,01	3,07 ± 0,01
°Brix*	0,5	0,6
Proteínas (%)	0,66	0,74
Furosina (mg furosina/100 g proteína)	782,1 ± 5,2	350,4 ± 6,3

*Solución de pectina al 1% (p/v)

Otro de los parámetros que se estudió en las pectinas fue el contenido en furosina. Este compuesto es un indicador de las etapas iniciales de la reacción de Maillard (RM), la cual se produce durante el procesado y posterior conservación de alimentos, generalmente, por interacción entre los grupos carbonilo de los carbohidratos reductores y los grupos amino libres de aminoácidos, péptidos o proteínas. Se trata de un buen indicador químico ya que nos da idea del comienzo de la reacción antes de que se puedan producir modificaciones posteriores más importantes, incluyendo el desarrollo de color que en algunos productos puede ser negativo (Corzo-Martínez y col. 2012). Hasta el momento, no se ha empleado la furosina como

parámetro de calidad de las pectinas. Dado que durante la obtención de pectina en polvo se incluyen tratamientos térmicos es factible que durante estas fases del proceso y su posterior almacenamiento se de la RM. Los valores mostrados en ambas muestras estuvieron dentro de los niveles encontrados para frutas deshidratadas (Megías-Pérez y col. 2014) siendo superior el de la pectina 4400. Dado que ambas presentaban similares valores de pH y proteína, y que la 4710 tenía mayor contenido en azúcares, cabría esperar un mayor contenido de furosina en la segunda. Sin embargo, la primera posee una mayor concentración de AGal el cual puede participar también en la RM, siendo además de una gran reactividad (Aoki y col. 2001). Además también podrían contribuir otros factores relacionados con el proceso de obtención: diferencias en las condiciones del proceso y posterior almacenamiento, diferencias en la fecha de elaboración, ya que la primera se elaboró un mes antes que la segunda y, finalmente, la adición de maltodextrinas en la 4710 que podría provocar un efecto de dilución en el correspondiente compuesto de Amadori formado, precursor de la furosina. A pesar de no existir datos previos de furosina en pectinas, Einhorn-Stoll y col. (2014) encontraron un mayor desarrollo de color en pectinas comerciales almacenadas en condiciones inadecuadas, aunque no indicaron ninguna hipótesis al respecto. Los resultados encontrados en nuestro trabajo, aunque preliminares, podrían indicar la utilidad de la furosina como parámetro de control de calidad de las pectinas comerciales ya que su evaluación podría evitar un mayor desarrollo de color, aspecto este último muy importante en su utilización como ingrediente en alimentos no coloreados.

Dado que las pectinas tienen un gran poder adsorbente de metales pesados se realizó un análisis de minerales mediante ICP-MS para comprobar la posible existencia de elementos que pudieran ser tóxicos o pudieran catalizar reacciones degradativas. Los grupos carboxílicos de las pectinas se caracterizan por tener tendencia a la captación de especies catiónicas. Por otro lado, se ha encontrado que el RG-II está presente en la pared celular de las plantas predominantemente como dímero ligado a ésteres del borato, contribuyendo a la fuerza e integridad de la planta y, además, contiene metales como Ca, Sr, Ba y Pb (Pellerin y col. 1998; Matsunaga y col. 2004). De los resultados del análisis semicuantitativo realizado (resultados no mostrados) se observó que ambas pectinas carecen del complejo RGII-borato puesto que no contienen el elemento B, siendo los elementos mayoritarios de ambas pectinas Na, K, Ca y Mg, de los cuales se realizó un análisis cuantitativo (Tabla 5). La presencia del elemento Na se debe al proceso de obtención de las pectinas en el cual uno de los pasos intermedios consistía en el intercambio de calcio de las pectinas por sodio de las resinas iónicas, como así indica el esquema de la Figura 7.

Tabla 5 Contenido en minerales de las pectinas (mg/g)

Elemento	Muestra	
	4400	4710
²³ Na	2,36	1,91
²⁴ Mg	0,32	0,16
³⁹ K	0,60	0,33
⁴⁴ Ca	4,15	1,14

4.1.2 Caracterización estructural

4.1.2.1 Composición monomérica

A continuación se determinó la composición en monosacáridos neutros y AGal de las pectinas, de gran importancia en la caracterización de las mismas, mediante hidrólisis con TFA 2 M según se ha indicado en *Materiales y Métodos*. El análisis se realizó por cromatografía de gases (GC) y la identificación de los

carbohidratos presentes en las pectinas industriales se basó en la comparación del tiempo de retención relativo de los distintos monosacáridos presentes en pectinas, así como de una mezcla de los mismos. En la Figura 10 se muestra un cromatograma tipo donde se puede apreciar que los principales azúcares liberados son: xilosa (Xil), arabinosa (Ara), ramnosa (Rha), manosa (Man), galactosa (Gal), glucosa (Glc) y AGal.

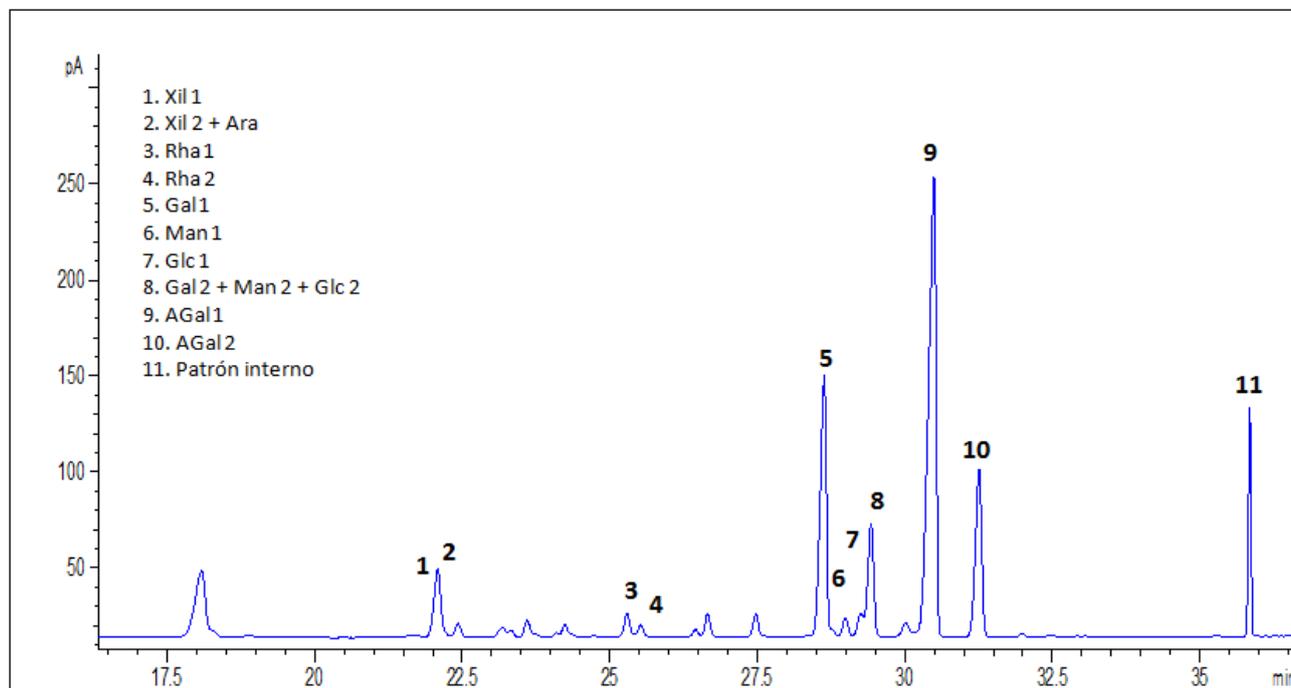


Figura 10 Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de los TMS-oximas de los carbohidratos presentes en la pectina 4400 tras su hidrólisis con TFA 2 M durante 4 h a 110 °C

Para realizar la cuantificación de los monosacáridos de las pectinas se estudiaron distintos tiempos de hidrólisis, entre 3 y 5 h; no se estudiaron tiempos menores ya que en estudios previos se había comprobado que eran insuficientes para alcanzar una hidrólisis satisfactoria. En la Figura 11 se representan los monosacáridos liberados, expresados en mg de monosacárido por gramo de pectina. Tal y como puede observarse, en estas pectinas se produce una hidrólisis máxima al cabo de 5 h, sin embargo las diferencias son mínimas respecto a la hidrólisis a las 4 h y, prolongando este proceso, puede verse favorecida la degradación de los monosacáridos (Wikiera y col. 2015). A medida que aumenta el tiempo de hidrólisis no es muy apreciable la mayor liberación de monosacáridos. Ambas pectinas, respecto al tiempo, se comportan de manera semejante, aunque en la pectina 4400 la proporción de AGal, compuesto por definición mayoritario en la pectina, es mucho mayor, mientras que en la pectina 4710 se produce una mayor liberación de azúcares neutros, especialmente glucosa. Esto corrobora la información facilitada por la industria suministradora que indica que este producto además de pectina incluye maltodextrina. En general, al analizar las pectinas se observa glucosa en pequeñas cantidades; este monosacárido no es propio de la pectina sino que proviene de otros polisacáridos presentes como contaminantes, como la celulosa y hemicelulosa, extraídos junto con la pectina. De esta forma, en los procesos de extracción de pectinas cuanto menor es la presencia de glucosa, más selectivo ha sido el proceso y mayor será la pureza de la pectina.

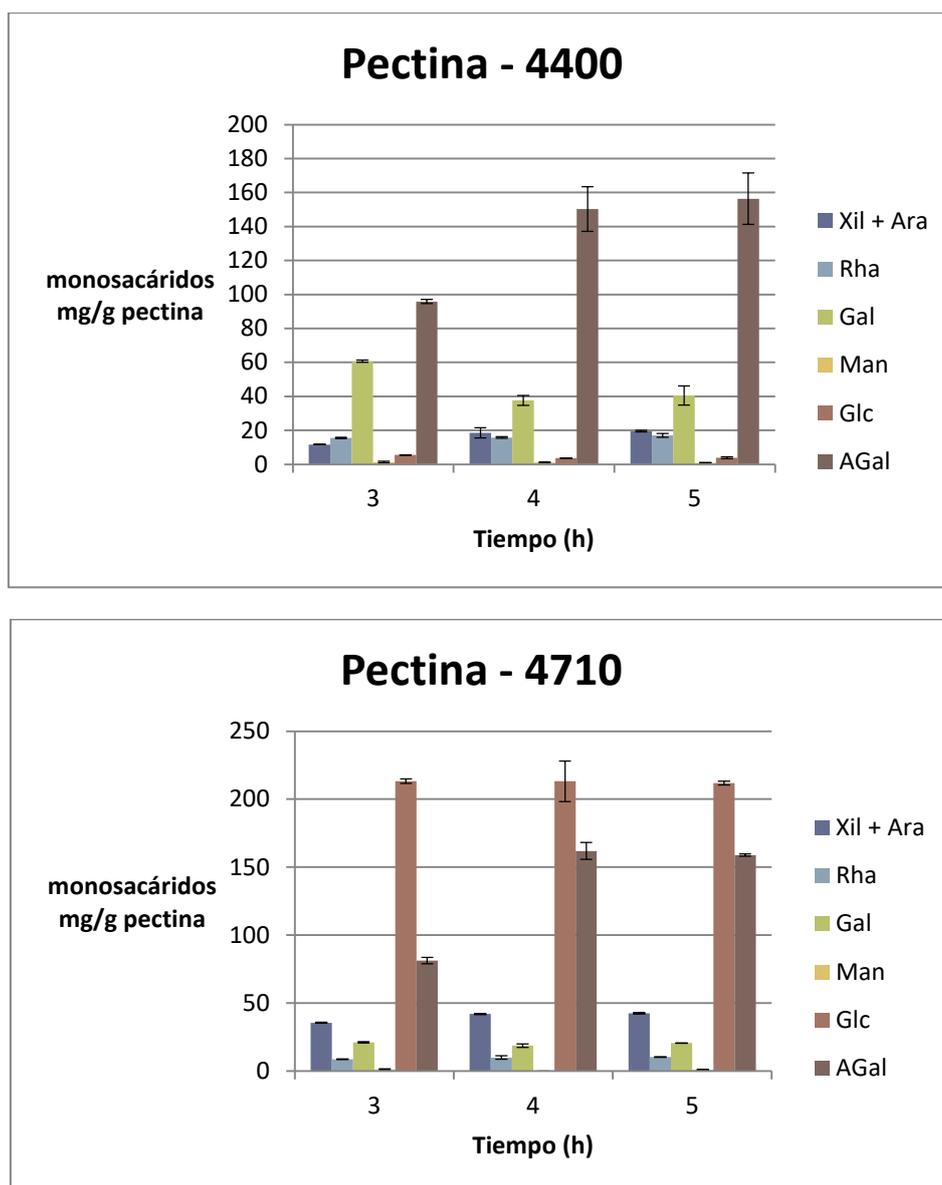


Figura 11 Monosacáridos liberados durante la hidrólisis ácida (TFA 2M, 110 °C) de las pectinas industriales

Durante el proceso de hidrólisis se van liberando los monómeros que forman la pectina, sin embargo, también se va produciendo la degradación de los monosacáridos liberados. Por tanto, en el proceso de hidrólisis ácida es necesario optimizar el tiempo de reacción, con objeto de evitar que la degradación de los monosacáridos sea más importante que la liberación, teniendo en cuenta que el comportamiento de cada monosacárido puede variar (Garna y col. 2004). Con objeto de conocer la composición monomérica de forma más correcta, se hidrolizó, en las mismas condiciones que las pectinas, durante 4 h, una mezcla conocida de monosacáridos y se calculó el % de recuperación para cada uno de ellos. Estos fueron: xilosa+arabinosa 64,9%, ramnosa 69,6%, galactosa 68,4%, manosa 70,6%, glucosa 72,3% y AGal 38,9%. Según se puede apreciar por estos valores el compuesto más sensible a la hidrólisis ácida es el AGal.

Teniendo en cuenta estos porcentajes de recuperación, se calcularon los porcentajes relativos frente al total de carbohidratos, tal y como se muestra en la Tabla 6. Como se puede ver, la pectina industrial 4400

presenta un contenido en AGal del 77%, por lo cual se podría comercializar directamente como ingrediente alimentario E-440, ya que este contenido es > 65% (FAO/OMS 2009). Por el contrario la 4710 no cumple este requisito ya que presenta también gran cantidad de glucosa debido a la adición de maltodextrinas.

En cuanto a los azúcares neutros propios de las pectinas, en la 4400 el más abundante es la galactosa, por el contrario en la pectina 4710 los más abundantes son xilosa+arabinosa. Según estos resultados se deduce que, en ambas pectinas, el HG es la estructura claramente mayoritaria, aunque según la relación AGal/Rha la pectina 4400 tiene una mayor proporción de RG-I que la 4710 (Morris y col. 2013). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Georgiev y col. (2012) y Thibault y col. (1993) quienes obtuvieron tras una hidrólisis de pectinas procedentes de cáscaras de cítricos mediante TFA durante 3 h a 121 °C y una hidrólisis con HCl 0,1 M a 80 °C durante 72 h, una composición como monómeros mayoritarios xilosa+arabinosa y galactosa seguida de ramnosa, siendo el AGal el compuesto mayoritario.

Tabla 6 Composición monomérica de las pectinas tras 4 h de hidrólisis ácida (valores expresados como % sobre monosacáridos totales)

	Xil+Ara	Rha	Gal	Man	Glc	AGal	AGal/Rha
4400	5,8	4,6	11,3	0,3	1,0	76,9	16,6
4710	8	1,7	3,4	-*	36,7	50,2	29,2

* No cuantificado por la gran proporción de glucosa

Según los resultados anteriores, dado que había maltodextrinas presentes en una de las pectinas se decidió comprobar la posible existencia de carbohidratos de bajo peso molecular libres (no ligados a la pectina) en las mismas; para ello se analizaron las pectinas sin hidrolizar. Como se puede apreciar en la siguiente Figura 12-A la pectina 4400 no presentaba este tipo de azúcares, por el contrario en la 4710 (Figura 12-B) podemos observar gran cantidad de glucosa (134,1 mg/g de pectina), maltosa (6,5 mg/g de pectina) y maltotriosa (10,3 mg/g de pectina).

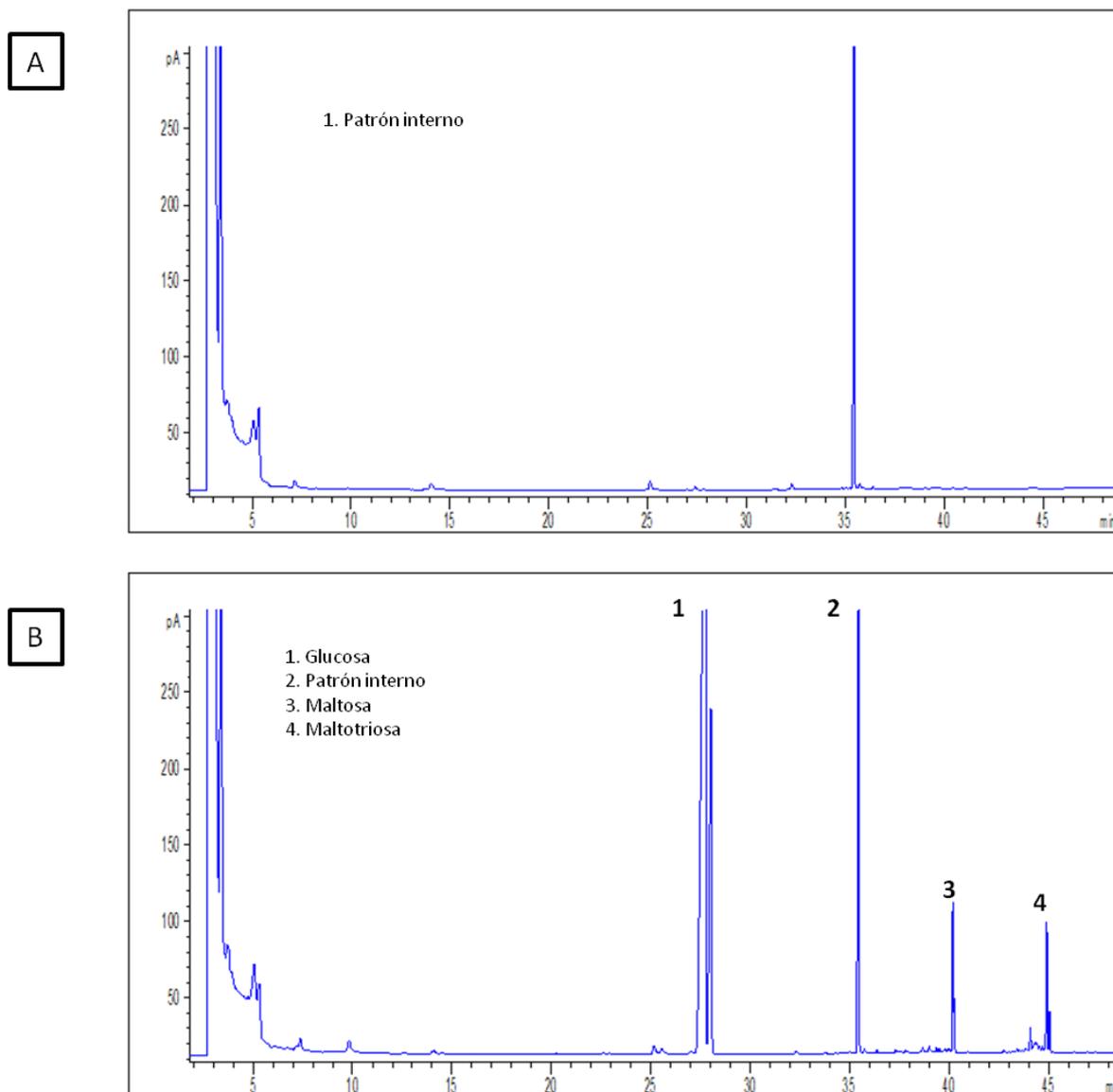


Figura 12 Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de la pectina 4400 (A) Y 4710 (B) sin hidrolizar

4.1.2.2 Distribución de las masas moleculares de la pectina

Para la estimación de la M_w de las pectinas se utilizó un método de HPLC- ELSD que fue preciso poner a punto. Para lo cual se realizó, en primer lugar, un diseño experimental con el fin de optimizar las condiciones del ELSD. Los parámetros más importantes a optimizar fueron: el flujo de gas (aire) (arrastra al eluyente hasta el nebulizador) y las temperaturas de nebulización (facilita que el eluyente forme un aerosol) y de evaporación (influye en la evaporación eficaz del aerosol). En la Tabla 7 se indican las distintas condiciones ensayadas y las áreas obtenidas tras la inyección directa de un pululano patrón (0,342 kDa) en el detector.

Tabla 7 Condiciones de temperaturas y flujo del gas del diseño experimental ensayadas para la optimización del ELSD

Temperatura de nebulización (°C)	Temperatura de evaporación (°C)	Flujo (mL/min)	Área
65	75	1,2	8228,7
65	75	1,6	5315,9
65	75	2	3660,8
75	85	1,2	9189,0
75	85	1,6	6026,9
75	85	2	3952,1
85	95	1,2	9503,9
85	95	1,6	6288,6
85	95	2	4530,8

Las condiciones seleccionadas fueron: temperatura de evaporación (85 °C), temperatura de nebulización (75 °C) y flujo de aire (1,2 mL/min) puesto que proporcionaba un valor de área muy elevado (9189). No se eligieron las condiciones en las que el área era 9503,9 debido a que las temperaturas de evaporación (95 °C), y nebulización (85 °C) eran muy elevadas. Los datos recogidos en la tabla 5 ponen de manifiesto la importancia de optimizar estos parámetros.

Una vez puesto a punto el detector ELSD se procedió a realizar un estudio de linealidad, sensibilidad y repetitividad o precisión de todo el sistema cromatográfico, para poder llevar a cabo no sólo la estimación de la M_w de las pectinas sino también la cuantificación de las fracciones moleculares presentes. Para ello se utilizaron diferentes soluciones de patrones de pululanos de M_w conocida y a diferentes concentraciones (0,342-805 kDa; 10-2500 mg/L). En primer lugar, para poder estimar la M_w se construyó una recta de calibrado siendo y el logaritmo de la M_w y x el volumen de elución. La recta de calibrado obtenida con la ecuación correspondiente se muestra en la Figura 13.

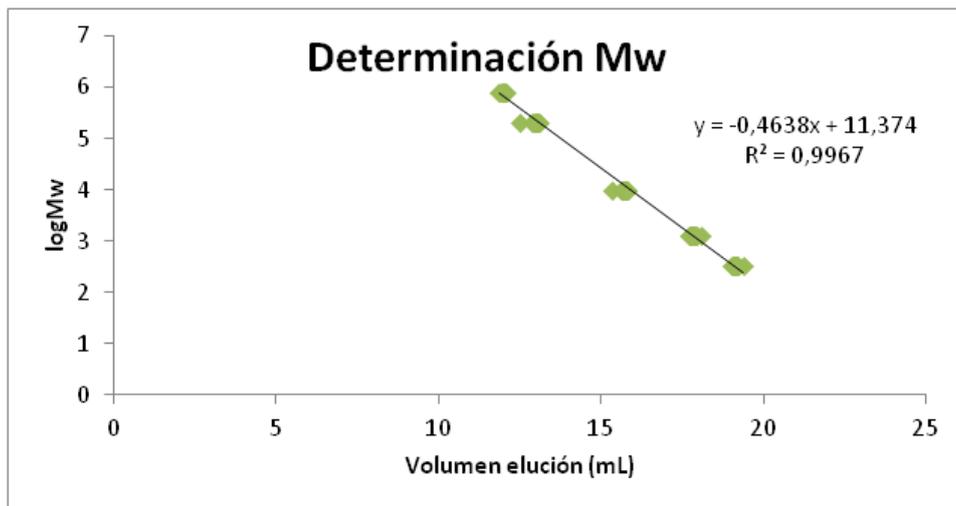


Figura 13 Recta de calibrado para la estimación de la M_w media

En el caso de la cuantificación de concentraciones, para el estudio de linealidad se representaron los valores de área frente a las concentraciones, obteniéndose una correlación cuadrática, obteniendo un buen R^2 (0.9265). Para intentar mejorar el ajuste, se representaron los logaritmos de ambos parámetros obteniéndose una correlación lineal con un mejor valor de R^2 (Figura 14), por tanto se eligió este tipo de representación y correlación para posteriores cuantificaciones.

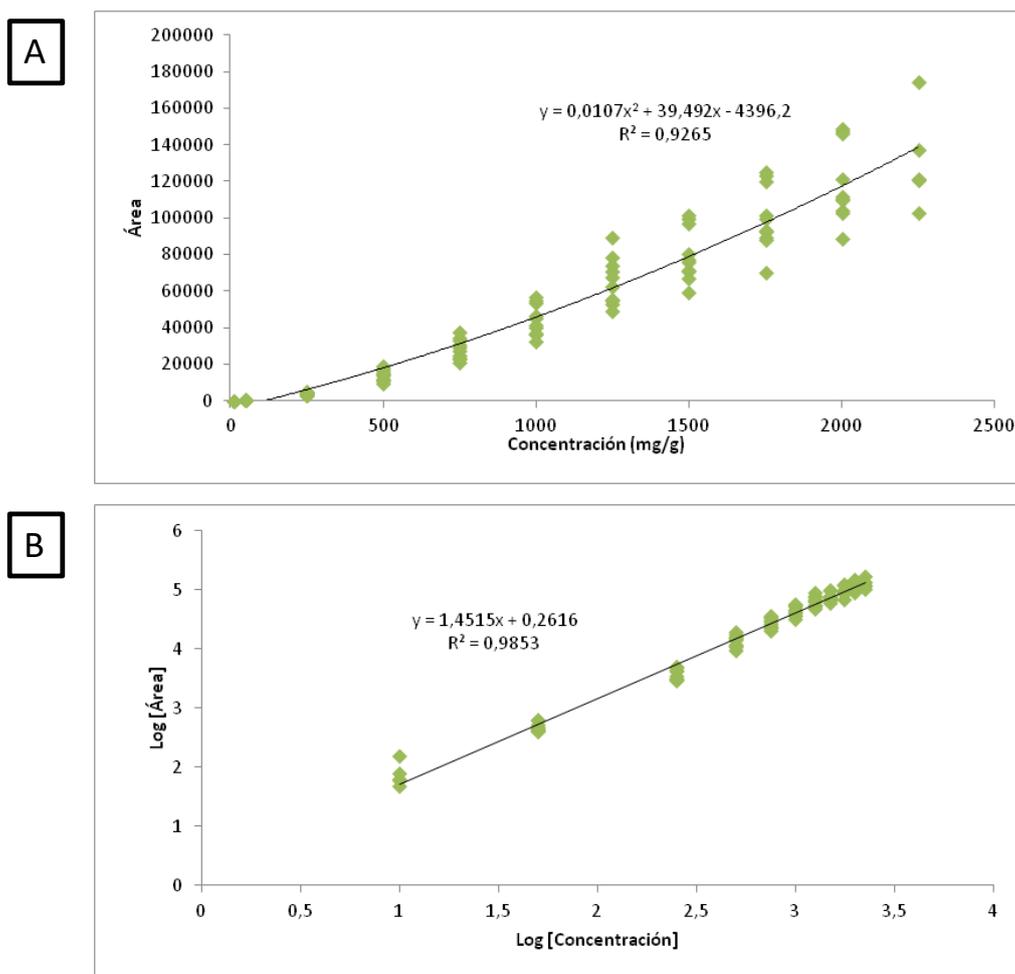


Figura 14 Recta de calibrado con una correlación cuadrática (A) y lineal (B) para la determinación de la concentración de pectina mediante HPLC-ELSD

Como se puede observar en la Tabla 8, las curvas de regresión para cada pululano mostraron una buena correlación con valores de $R^2 > 0,989$. Según la literatura, la pendiente tiene valores generalmente comprendidos entre 0,9 y 1,8, siendo 1,3 el valor más representativo, coincidiendo con los resultados obtenidos por Condezo-Hoyos y col. (2015) ($>1,39$). El ELSD demostró ser muy sensible para el análisis de los patrones de pululanos con diferente M_w presentando valores de LOD y LOQ entre 4,1-5,0 y 9,4-11,4 mg L^{-1} .

Tabla 8 Estudio de linealidad, sensibilidad y límites de detección y cuantificación del ELSD

Mw pululanos (kDa)		Tiempo de retención (min)	Sensibilidad ¹		Linealidad (R ²)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Teórica	Experimental		Pendiente (m)	Ordenada en el origen (b)			
0,34	0,32	38,27 ± 0,14	1,3964	0,989	0,9886	4,92	11,30
1,32	1,30	35,67 ± 0,18	1,4717	0,991	0,9914	4,95	11,36
10,00	12,26	31,43 ± 0,20	1,4749	0,992	0,9919	4,72	10,82
200,00	227,83	25,96 ± 0,24	1,4472	0,992	0,9918	4,11	9,41
805,00	661,11	23,95 ± 0,09	1,4674	0,993	0,9933	4,48	10,28

LOD= Límite de detección; LOQ= Límite de cuantificación ¹ Ecuación: $\text{Log Área} = m \text{ Log Concentración} + b$

A continuación se determinó la repetitividad cromatográfica (Tabla 9) tras la inyección de pectina de cítricos comercial cinco veces en distintos días y se calculó el coeficiente de variación (CV) que, para las áreas, fue del 9.4%. Este valor se puede considerar muy bueno aplicado a este tipo de cromatografía, ya que la técnica SEC se considera semicuantitativa con otros detectores como el de índice de refracción. En cuanto a la precisión del tiempo de retención, aunque su CV es inferior al del área (5,4%) esto no significa que sea mejor su repetitividad, dadas las características diferentes de este tipo de cromatografía frente a otras. Como se ha indicado anteriormente, para la estimación de las M_w media es preciso transformar el tiempo de retención en volumen de elución considerando el flujo y relacionarlo con el logaritmo de la M_w . Es esta transformación logarítmica la que magnifica la variación de los tiempos de retención. La repetitividad del método se evaluó preparando cinco veces una muestra y pinchándola el mismo día. Según se puede observar el CV fue inferior al de la precisión analítica para ambos parámetros, área y tiempo de retención, siendo especialmente bajo para este último parámetro. Por tanto, el método empleado en este trabajo permite la determinación de la M_w , aunque es preciso hacer un calibrado cada día. Estos datos son semejantes a los de Condezo-Hoyos y col. (2015) para el análisis de pectina de manzana, si bien, estos autores, encontraron valores algo menores para los CV de las áreas y mayores para la repetitividad del tiempo de retención.

Tabla 9 Estudio de precisión del método HPLC-ELSD

	Precisión analítica		Precisión cromatográfica	
	t retención	Área	t retención	Área
Media	24,8	7857	26,7	3722
DE	1,3	738	0,3	94
CV (%)	5,4	9,4	0,9	2,5

Una vez optimizado el detector ELSD y el método cromatográfico, se procedió al análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras de pectinas industriales (Tabla 10). Se muestran a continuación dos cromatogramas obtenidos tras el análisis de las pectinas por HPLC-ELSD (Figura 15), donde se puede apreciar que, en ambas pectinas 4400 y 4710, eluye un pico minoritario en el minuto 19 y un pico mayoritario en el minuto 25, correspondiente a especies moleculares englobadas como pectina. En la pectina 4710 eluyen dos picos más entre los minutos 35 y 41 tratándose, probablemente, estos últimos de la maltodextrina, tal y como indica en su composición. Del mismo modo, se puede apreciar en la Tabla 11 que la pectina 4400 presenta una mayor concentración (731 mg/g) de especies con M_w media de 472 kDa, puesto que su composición se basa solamente en pectina, a diferencia de la 4710 que presenta una menor concentración (499 mg/g) de especies con M_w media 553 kDa, 73 mg/g que pueden corresponder a maltodextrinas y 146 mg/g de glucosa. Los datos de glucosa obtenidos por GC-FID (134,1 mg/g) están en gran concordancia con los obtenidos aquí para el pico de M_w 0,19.

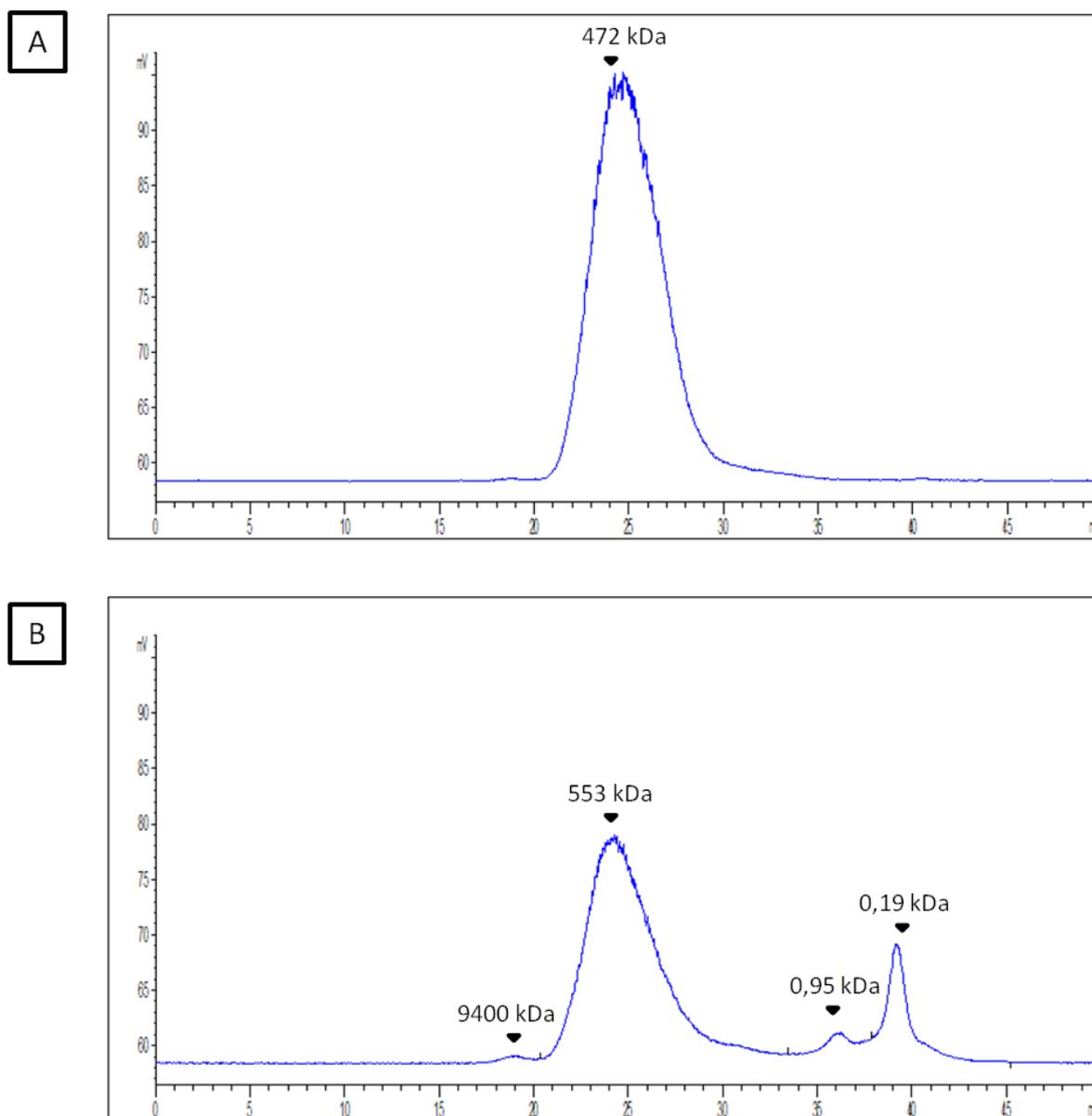


Figura 15 Cromatogramas obtenidos por HPLC-ELSD de las pectinas industriales: (A) pectina 4400 y (B) pectina 4710

Tabla 10 Cuantificación de la concentración y de la masa molecular media de los carbohidratos presentes en las pectinas industriales

Muestras pectinas	Picos	M _w (kDa)	Concentración (mg/g)
4400	1	10400*	21,3 ± 13,4
	2	472	731,2 ± 2,9
4710	1	9400*	27,0 ± 2,5
	2	553	498,8 ± 0,1
	3	0,95	72,7 ± 0,2
	4	0,19	146,4 ± 5,2

*Fuera del intervalo de M_w de los pululanos

4.1.2.3 Grado de esterificación

Como es sabido, uno de los parámetros estructurales importantes de las pectinas es el DE, ya que determina gran parte de sus propiedades tecnofuncionales. El espectro FT-IR y los grupos funcionales de las pectinas industriales objeto de estudio y la correspondiente naturaleza de las bandas se presentan en la Figura 16 y en la Tabla 11. En la figura se puede apreciar que los espectros tienen similares tendencias para ambas pectinas. El primer pico presenta una amplia y fuerte banda de absorción entre 3600 y 2500 cm⁻¹ que corresponde a la vibración de O–H debido a puentes de hidrógeno inter e intramoleculares localizados en la cadena principal del polímero de AGal. Las bandas entre 3000 y 2800 cm⁻¹ se deben a las vibraciones tensión de C–H incluyendo los grupos CH, CH₂ y CH₃. La región referida a los grupos carboxilos (1750-1350 cm⁻¹) tiene un especial interés para la evaluación del DE. Otras bandas de menor importancia en muestras de pectinas son las de las vibraciones de C–H las cuales tienen lugar entre 1300 y 1000 cm⁻¹ (Singthong y col. 2004).

El DE se define como (número de grupos carboxilo esterificados/número total de grupos carboxilo) x 100, y se calculó siguiendo el método descrito por Singthong y col. (2004) (Singthong y col. 2004).

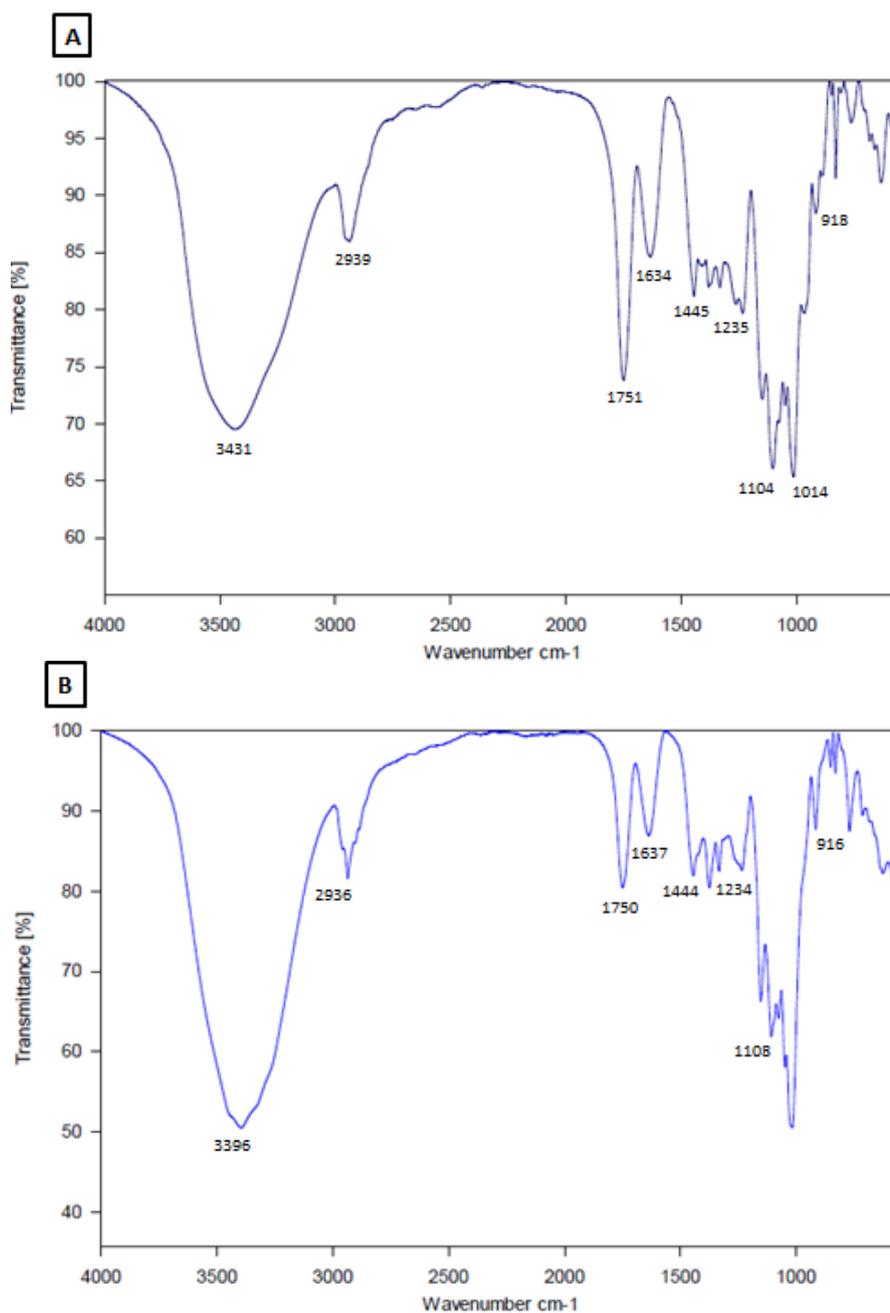


Figura 16 Espectros FT-IR para la pectina 4400 (A) y 4710 (B)

Para determinar el DE se ha tenido en cuenta las bandas $1750\text{-}1751\text{ cm}^{-1}$ (correspondientes al número de grupos carboxilos esterificados) y las bandas $1634\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$ y $1750\text{-}1751\text{ cm}^{-1}$ (correspondientes al número total de grupos carboxilos). La pectina 4400 presenta un DE del 70,7% (58%, según el informe de la empresa) mientras que la pectina 4710 del 64,4% (71%, según el informe de la empresa), clasificándolas como pectinas de alto metoxilo, las cuales se caracterizan por formar geles estructural y térmicamente estables, lo que las hace adecuadas para su uso en conservas, productos de panadería, confitería y bebidas (Sriamornsak 2016; Thakur y col. 1997).

Tabla 11 Bandas correspondientes al espectro FT-IR de las muestras de pectinas industriales

Grupos funcionales	Picos (cm^{-1})	
	4400	4710
O–H st	3431	3396
C–H st	2939	2936
C = O st as	1751	1750
C = O st s	1634	1637
C–H δ	1445	1444
O–H δ ip	1235	1234
C–O–C st as	1104	1108
C–O–C st sim	1014	1017
OC–OH δ oop	918	916

st: tensión; as: asimétrica; s: simétrica; δ : flexión; ip= dentro del plano; oop: fuera del plano

A la hora de determinar el DE es importante elegir un método preciso. Aunque se puede realizar la determinación del este parámetro según otros métodos, como por ejemplo colorimetría, quizás sea la FT-IR una de las más empleadas. Manrique y col. (2002) demostraron que FT-IR es una técnica adecuada para el análisis del DE en pectinas y señalaron, que otros polisacáridos estructurales solubles en etanol o acetona, así como sacarosa, glucosa, fructosa, ácidos orgánicos, pigmentos, etc, no interfieren en la evaluación del DE en pectinas empleando dicha técnica. Así, en nuestros análisis la presencia de maltodextrinas en la pectina 4710 no produjo, probablemente, ningún tipo de interferencia y la diferencia de nuestros valores de DE respecto a los de la empresa podrían deberse a la utilización de diferente metodología.

4.2 Propiedades de la pectina

4.2.1 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de las pectinas industriales se estudiaron mediante DSC. El análisis térmico de polímeros proporciona datos muy específicos relacionados con transiciones térmicas. La determinación de flujos de temperatura y calentamiento ofrece información útil sobre las propiedades y el comportamiento térmico de las muestras. Esto es crucial para el conocimiento de los cambios estructurales producidos durante el procesamiento de las materias primas que contienen pectinas (Einhorn-Stoll y col. 2014; Einhorn-Stoll y col. 2007; Karaki y col. 2016). La degradación térmica de pectina en polvo es un tema complejo ya que

depende de la composición, de los parámetros moleculares y de la modificación química que ésta sufra (Monfregola y col. 2011).

Tal y como se muestra en el termograma de las pectinas comerciales (Figura 17), el pico endotérmico, correspondiente a la temperatura de fusión (*melting*) para la pectina 4400 es a 108,0 °C mientras que para la pectina 4710 es a 96,6 °C, lo cual indica que esta última sería menos estable a la temperatura que la primera. En la pectina 4710 aparece otro pico de menor intensidad que corresponde a otra temperatura de fusión (157,1 °C). Según ha sido descrito por algunos autores, esto puede deberse a un elevado contenido en proteínas o bien a otras sustancias desconocidas. Puesto que esta pectina incluye maltodextrina en su composición, este pico endotérmico podría atribuirse a su presencia, como así se confirma en los trabajos de Sansone y col. (2011) y Wang y col. (2014). Según la literatura, la presencia de un pico endotérmico sobre los 100 °C se atribuye a la evaporación de agua en muestras de pectinas. Esta pérdida de agua corresponde a la naturaleza hidrofílica de grupos funcionales presentes en la muestra. Además de ser debido a la volatilización del agua, puede deberse a la fusión de la pectina y a una posible desmetilación, hidroxilación y descarboxilación (Combo y col. 2013; Osorio y col. 2011; Wang y col. 2014; Karaki y col. 2016).

Por otro lado, los picos exotérmicos reflejan la degradación de la muestra y determinan la temperatura de degradación, relacionada con el perfil químico de la muestra. Los valores de la temperatura de degradación de las pectinas 4400 (249,8 °C) y 4710 (252,0 °C) indicaron que ambas muestras tienen un perfil químico muy similar (Wang y col. 2014; Karaki y col. 2016). Einhorn-Stoll y col. (2012) obtuvieron valores de temperatura de degradación para distintas pectinas de cítricos que oscilaban entre 220 y 240 °C. Por otra parte, Wang y col. (2014) en pectinas de cítricos extraídas con agua subcrítica en distintas condiciones calcularon unas temperaturas de fusión entre 105 y 137 °C y de degradación entre 237 y 243 °C.

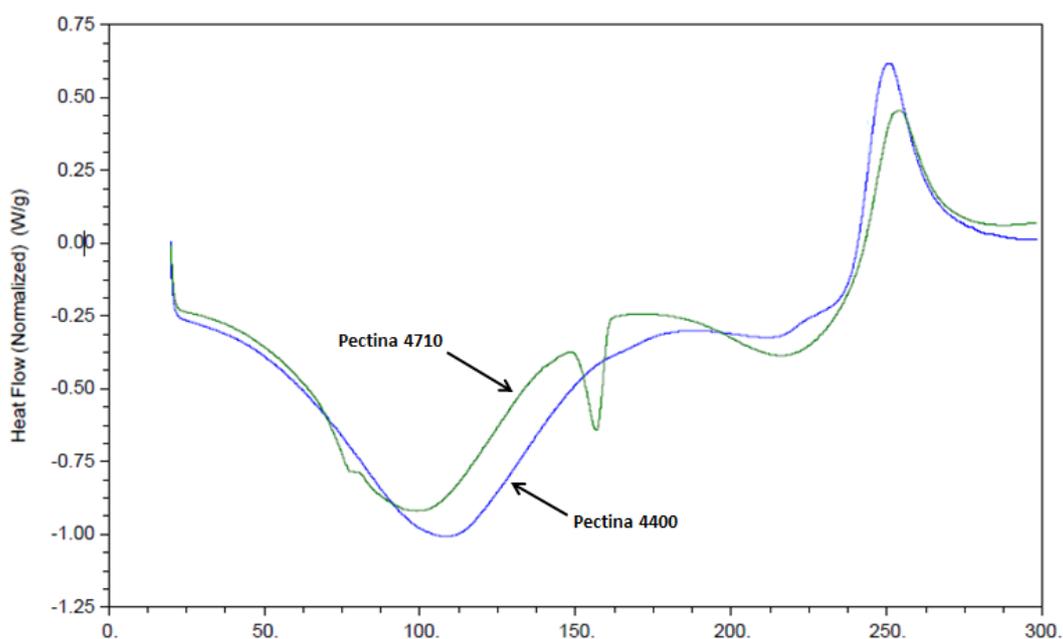


Figura 17 Termograma DSC de muestras de pectinas industriales

4.2.2 Propiedades reológicas

El comportamiento reológico de los hidrocoloides es una característica crucial a tener en cuenta durante el procesado y diseño de alimentos, ya que este comportamiento se puede ver afectado durante el procesado (procesos de extracción, filtración, extrusión, purificación, evaporación), almacenamiento, transporte y comercialización hasta su consumo. Las características reológicas son un indicador de calidad y juegan un papel importante en la aceptación de los productos (Marcotte y col. 2001).

La viscosidad de la mayor parte de las sustancias puede verse afectada sensiblemente por su naturaleza, la temperatura, la presión, la velocidad y el tiempo de cizalla, e incluso la presencia de campos eléctricos y magnéticos. De todas estas variables la más importante, desde el punto de vista reológico, es la velocidad de cizalla. El modelo de Newton asume que existe una proporcionalidad directa entre el esfuerzo aplicado y el gradiente de velocidad de cizalla producido y su representación gráfica se denomina curva de flujo (Figura 18). En un líquido Newtoniano la curva de flujo es una línea recta. Otra forma de representar el comportamiento del flujo es mediante las llamadas curvas de viscosidad, en donde se representa ésta en función de la velocidad de cizalla. En los líquidos Newtonianos la viscosidad no varía con la velocidad de cizalla. Toda sustancia que no cumpla ese requisito se considera no Newtoniana. En los fluidos no Newtonianos la viscosidad tiende a disminuir a medida que aumenta la velocidad de cizalla, comportamiento conocido como fluidificación por cizalla (*shear-thinning*) (Marcotte y col. 2001; Moreno 2005). Estos fluidos presentan tres tipos de comportamiento diferenciados: plástico, pseudoplástico y dilatante. Además, tienen un umbral mínimo de fluencia (*yield stress*) que se debe superar para que empiecen a fluir y en reposo presentan una estructura tridimensional irregular y desordenada, lo cual origina una gran resistencia interna al flujo. Otra característica de estos fluidos es que la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de deformación (Pagan 1996).

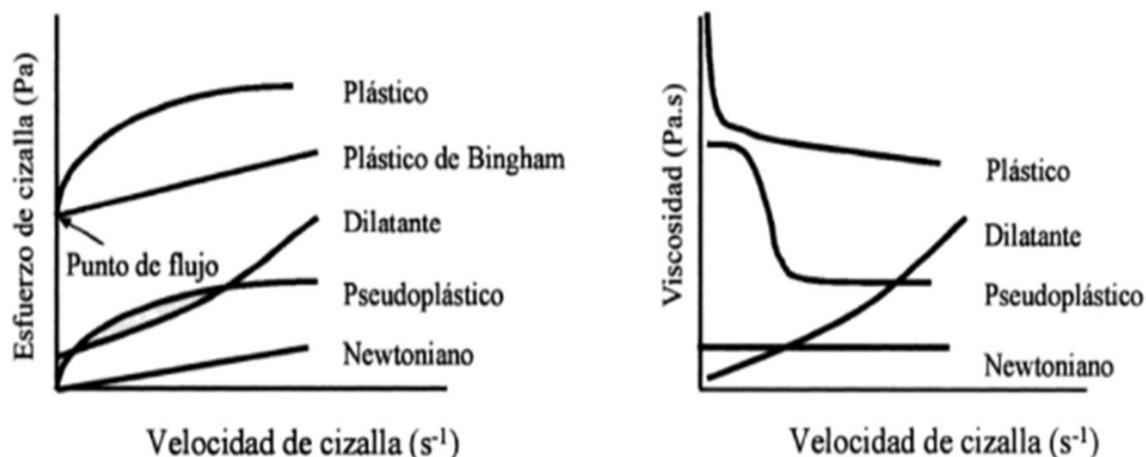


Figura 18 Curvas de flujo y viscosidad de los distintos tipos de comportamiento reológico (Moreno 2005)

Como se ha indicado en *Materiales y Métodos*, en este trabajo la representación gráfica del efecto de la velocidad y tiempo de cizalla se llevó a cabo mediante curvas de flujo y viscosidad, y se estudiaron diferentes modos de formar la dispersión empleando una placa magnética y un agitador de varillas, ambos sin y con un posterior tratamiento de US, dado que los US de potencia pueden provocar por cavitación la degradación mecánica del polímero y facilitar la formación de la dispersión (Zhang y col. 2013).

4.2.2.1 Efecto de la velocidad de cizalla

A continuación se muestra, a modo de ejemplo, la Figura 19 en la que se observa cómo afecta, a la viscosidad y al esfuerzo de cizalla la velocidad de cizalla aplicada.

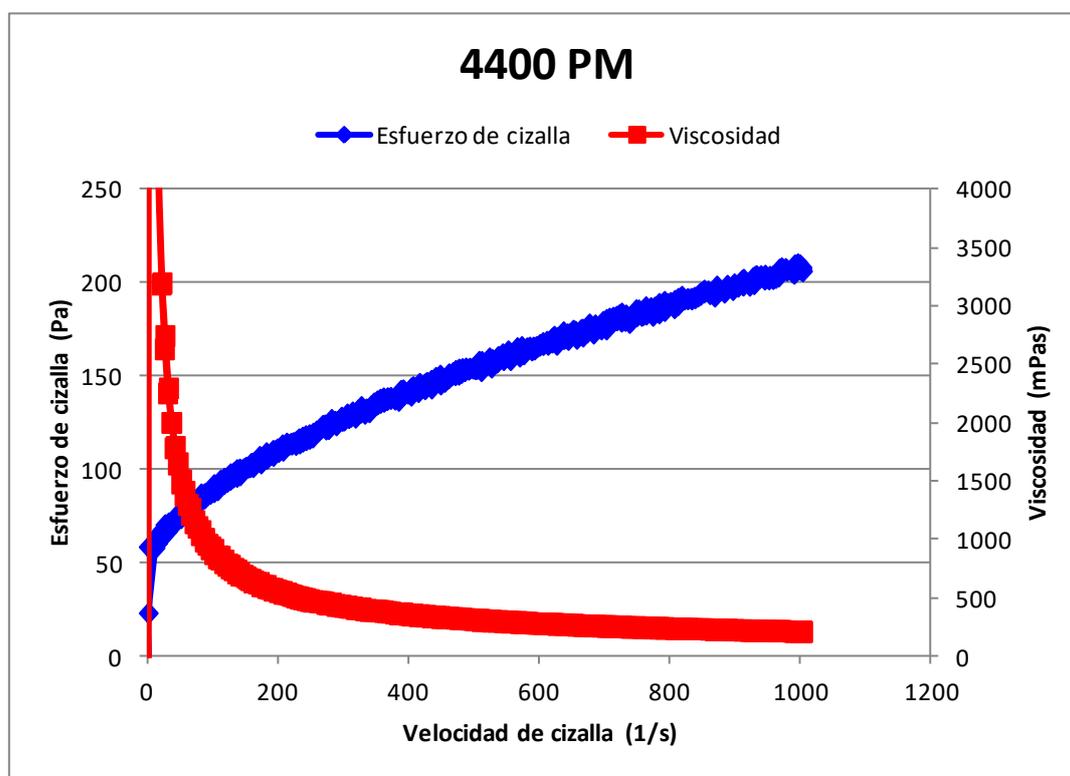


Figura 19 Representación gráfica de la viscosidad y esfuerzo de cizalla en función de la velocidad de un gel de pectina 4400 preparado en placa magnética (3%)

En la figura anterior, se observa que al aumentar la velocidad de cizalla disminuye la viscosidad y aumenta el esfuerzo de cizalla, lo cual está de acuerdo con un comportamiento no Newtoniano y pseudoplástico (*shear-thinning*), de forma similar a lo mostrado en la literatura. Este mismo comportamiento ha sido observado en pectinas procedentes de manzanas (Chen y col. 2012), de cacao (Vriesmann y col. 2013) y de frutos de plátano (*Musa*ABB) (Bello-Lara y col. 2014), entre otros frutos.

El porcentaje de histéresis da idea de la estabilidad de las pectinas bajo ciertas condiciones de esfuerzo de cizalla, de tal manera que es un indicativo directo de su potencial de aplicación en alimentos que sufren constantes deformaciones. En la Figura 20, se muestran diferentes gráficas comparativas del efecto de la velocidad de cizalla en la viscosidad del gel según el tipo de pectina y su forma de preparación. Tal y como se muestra, las tendencias fueron similares en ambas pectinas. En la gráfica modelo (Figura 18) no se observa el fenómeno físico de histéresis (separación entre los barridos ascendentes y descendentes), lo cual indica que cuando las pectinas se someten a esfuerzos de cizalla (esfuerzos cortantes) mantienen su estabilidad y esto es función del tiempo que dura la aplicación del esfuerzo (Hernández 2015).

4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

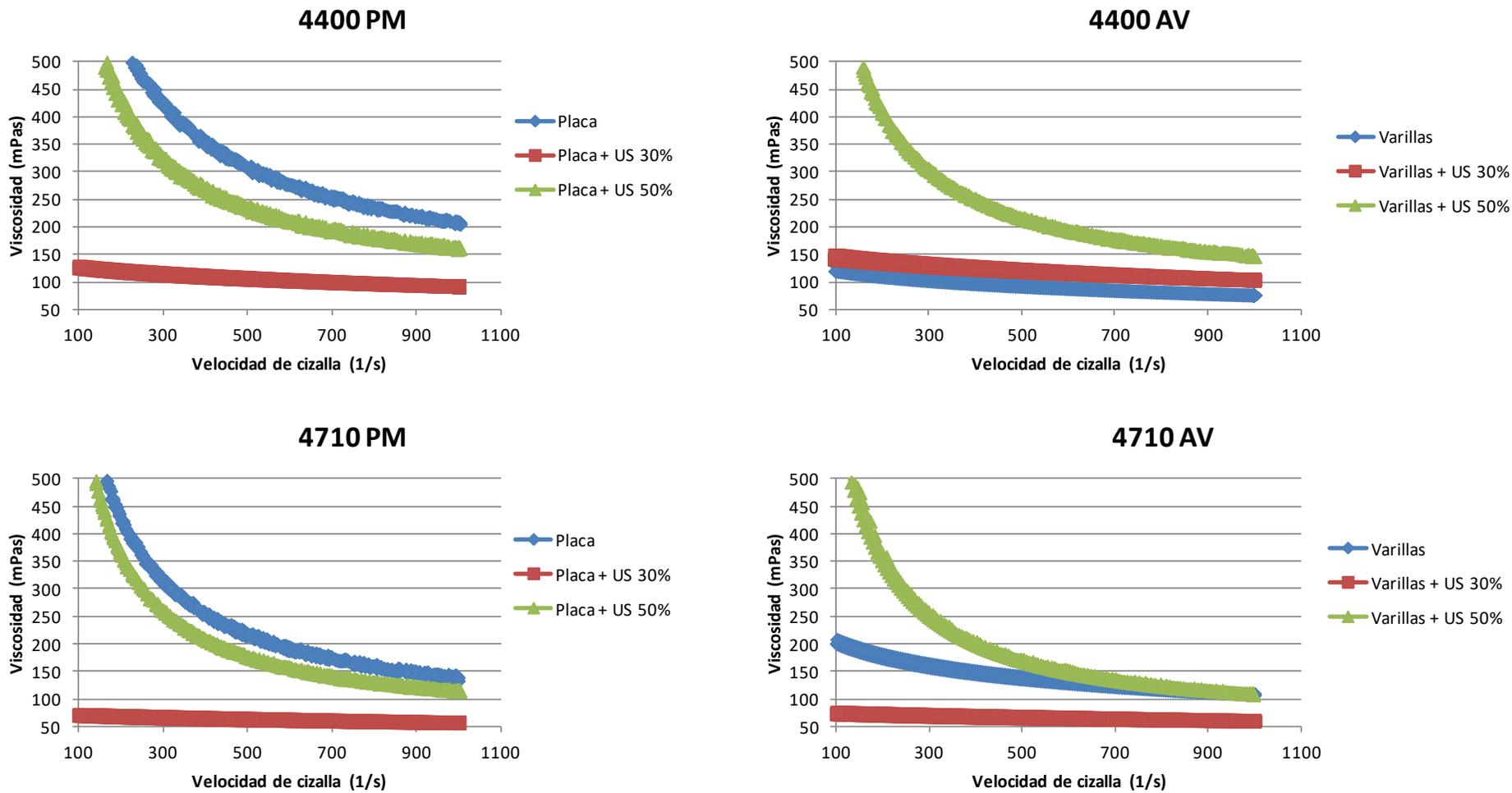


Figura 20 Representación de curvas de viscosidad pertenecientes al Programa A ($\dot{\gamma}=0-1000 \text{ s}^{-1}$ (30 s); $\dot{\gamma}=1000 \text{ s}^{-1}$ (600 s); $\dot{\gamma}=1000-0 \text{ s}^{-1}$ (30 s)) de las pectinas preparadas con placa magnética y con varillas en el intervalo de 0 y 1000 s^{-1}

Partiendo de las gráficas anteriores se puede conocer el valor de la viscosidad en el punto en el que puede considerarse que se alcanza el equilibrio (1000 s^{-1}). Estos datos son los que se recogen en la Tabla 12, en la que además, se indican también los valores empleando el programa B (en *Materiales y Métodos*, Figura 9).

Tabla 12 Valores medios de viscosidad según la pectina, tratamiento y el programa empleado para evaluar las propiedades reológicas

Valores medios de viscosidad (25 °C)				
Tratamientos*	Pectina 4400		Pectina 4710	
	Programa A ¹ (mPa•s)	Programa B ² (mPa•s)	Programa A ¹ (mPa•s)	Programa B ² (mPa•s)
AV	76,4	73,8	107,9	110,9
AVUS 30%	103,8	106,5	60,2	62,1
AVUS 50%	147,6	147,3	109,1	107,2
PM	205,2	207,1	133,1	142,8
PMUS 30%	92,3	94,7	57,0	58,8
PMUS 50%	161,4	164,1	115,2	121,3

*Tratamientos: PM= placa magnética; PMUS= placa magnética + US (30%); AV= agitador de varillas; AVUS= agitador de varillas + US (30%)

¹ Programa A: $\dot{\gamma}=0-1000 \text{ s}^{-1}$ (300 s) $\dot{\gamma}=1000 \text{ s}^{-1}$ (60 s) $\dot{\gamma}=1000-0 \text{ s}^{-1}$ (300 s)

² Programa B: $\dot{\gamma}=0-1000 \text{ s}^{-1}$ (30 s) $\dot{\gamma}=1000 \text{ s}^{-1}$ (600 s) $\dot{\gamma}=1000-0 \text{ s}^{-1}$ (30 s)

Según se puede observar, con ambos programas de variación de la velocidad de cizalla (A y B) el comportamiento de las pectinas no varía. Como puede verse en la Tabla 12, en general, la pectina 4400 presentó valores mayores de viscosidad que la 4710, salvo en el caso del gel preparado con varillas. También, en general, se observaron mayores valores de viscosidad empleando la placa magnética, en comparación con las varillas. Por otra parte, salvo en los geles preparados con la 4400 mediante agitador de varillas, se detectó una menor viscosidad tras haber aplicado US a una amplitud del 30%, produciéndose el efecto opuesto tras la aplicación de US a una amplitud del 50%. Sin embargo, según la literatura, a medida que el tiempo e intensidad de sonicación incrementan, la fuerza del gel se reduce y, por tanto, su viscosidad (Donghong y col. 2013; Seshadri y col. 2003). Nuestros resultados pueden ser explicados en base a que, en general, los efectos de los US aumentan a medida que aumenta la intensidad, pero esta regla no es lineal. Esto se debe al número de burbujas de cavitación producidas, ya que llega un punto en el que se produce tan elevado número de burbujas que éstas actúan de barrera frente a la transmisión de energía, viéndose reducido el efecto de los US. Del mismo modo, la temperatura alcanzada durante los tratamientos de US está relacionada con la eficacia del tratamiento por que, cuando la temperatura aumenta, las burbujas formadas colapsan antes, desprendiendo menor cantidad de energía y disminuyendo la eficacia de los US.

Tendencias semejantes fueron obtenidos por Zhang y col. (Zhang y col. 2015) quienes basaron sus estudios sobre las propiedades reológicas de un gel en estos dos parámetros importantes, el efecto de la intensidad de los US y de la temperatura alcanzada durante el tratamiento. Teniendo en cuenta lo anterior y que, en los tratamientos con una amplitud del 30%, se alcanzó una temperatura de 40 °C y con una amplitud del 50% se alcanzaron los 50 °C, puede explicarse que los tratamientos a un 50% hayan sido menos eficientes en la disminución de la viscosidad. Los resultados obtenidos, por tanto, ponen de relieve la amplia diversificación de pectinas, con distintas características reológicas, que se pueden obtener según el tratamiento empleado para la formación del gel, lo cual resulta muy interesante y versátil en la preparación de una amplia gama de productos alimentarios.

4.2.2.2 Efecto del tiempo de cizalla

Los fluidos que presentan un comportamiento reológico dependiente del tiempo se caracterizan porque su viscosidad aparente depende no sólo de la velocidad de deformación, sino también del tiempo que está actuando el gradiente de velocidades. Este tipo de fluidos se clasifican en tixotrópicos y reopécticos, según cómo se comporte la viscosidad frente al esfuerzo que provoca la deformación y a un gradiente de velocidad determinado, en el tiempo. El concepto de fluido tixotrópico según la revisión bibliográfica “*Thixotropy*” publicada por Barnes (1997), se describe como una estructura que experimenta una descomposición a nivel microestructural y, por tanto, una variación en sus propiedades reológicas, que se traduce en que a medida que se incrementa el tiempo del esfuerzo disminuye la viscosidad. Estos efectos ocurren de manera reversible e isotérmica según cambie la aplicación de la velocidad de cizalla, recuperándose la estructura original cuando la velocidad de cizalla cesa (Figura 21). Sin embargo, en el caso de fluidos reopécticos la viscosidad aumentaría con el tiempo de aplicación del esfuerzo.

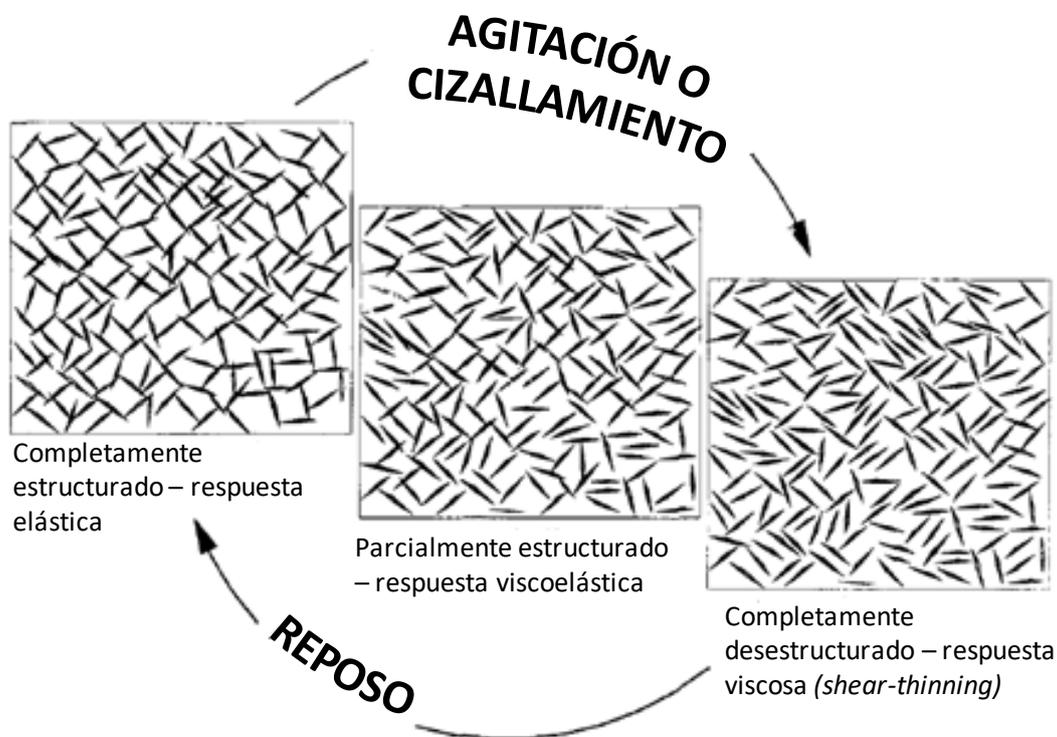


Figura 21 Modelo de estructura tixotrópica en función del esfuerzo de cizalla aplicado (Barnes A. 1997)

En un material tixotrópico la aplicación de una velocidad de cizalla constante provoca que la viscosidad disminuya hasta llegar a un punto donde permanece en un valor constante. Para entender los distintos resultados según los tratamientos en las muestras de las pectinas industriales, se representa gráficamente en la Figura 22 una curva de viscosidad típica para un comportamiento tixotrópico.

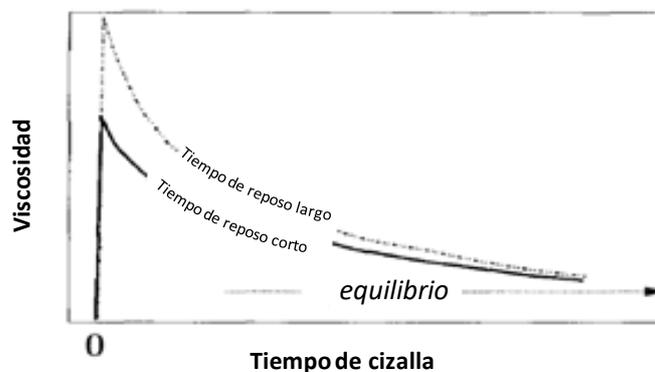


Figura 22 Curva de viscosidad modelo para un comportamiento tixotrópico (Barnes A. 1997)

A continuación se muestran el comportamiento del esfuerzo de cizalla y de la viscosidad en función del tiempo (Figura 23). Los tratamientos elegidos en base a los resultados expuestos en *Efecto de la velocidad de cizalla*, corresponden a los valores de viscosidad más bajos (4400 AV y 4710 PMUS 30%) y los valores de viscosidad más altos (4400 PM y 4710 PM).

Como se puede ver en todas las representaciones, cuanto más tiempo se somete el fluido a esfuerzos de cizalla, más disminuye su viscosidad. **Cuando la velocidad de cizalla se mantiene constante (1000 s^{-1}) el fluido alcanza una viscosidad de equilibrio.** La tixotropía varió según el tratamiento encontrándose valores en los intervalos de 69 a 27130 Pa/s y de 1712 Pa/s a 28560 en las pectinas 4400 y 4710, respectivamente, los cuales están de acuerdo con los obtenidos previamente para pectinas comerciales de cítricos (Chaires y col. 1993) y pectinas frescas de limón (Laurent y col. 2003).

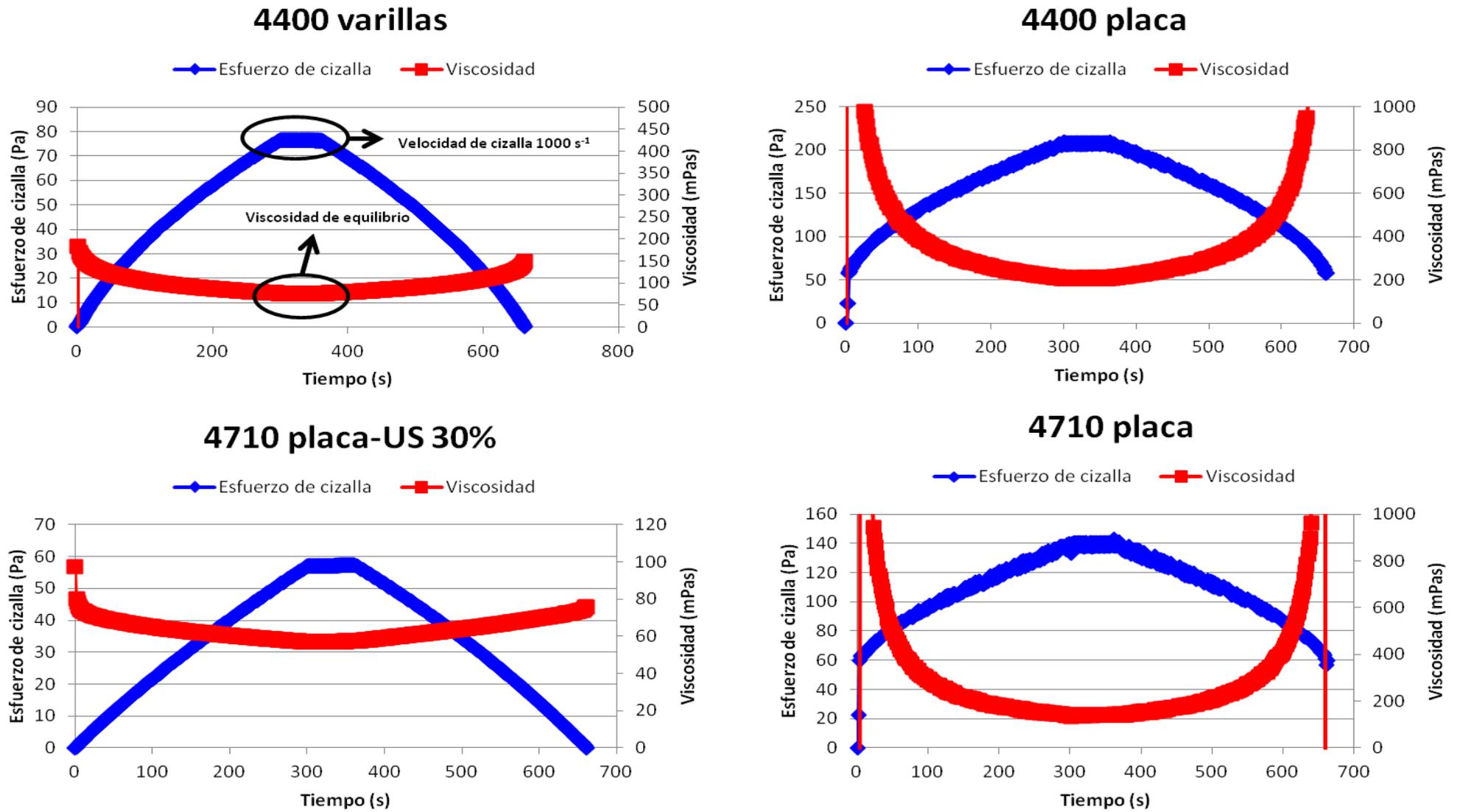


Figura 23 Representación gráfica de las curvas de flujo y viscosidad CR (Controlled Rate) $\dot{\gamma}=0-1000 \text{ s}^{-1}$ (300 s) / $\dot{\gamma}=1000 \text{ s}^{-1}$ (60 s) / $\dot{\gamma}=1000-0 \text{ s}^{-1}$ (300 s) en función del tiempo (s) a 25 °C

4.3 Aplicación de la pectina en el recubrimiento de fresas

Para los ensayos de recubrimiento con geles de pectina se eligió la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) que es un fruto no climatérico caracterizado por ser una fuente de compuestos bioactivos beneficiosos como vitaminas C, E, β -carotenos y compuestos fenólicos (Gol y col. 2013). Presenta una vida útil muy corta por su elevado contenido en humedad y carencia de cubierta protectora lo que favorece una elevada actividad metabólica y microbiana (Restrepo y col. 2010; Guerreiro y col. 2015). Este fruto resulta especialmente susceptible al ataque del hongo *Botrytis cinerea* (Hernández-Muñoz y col. 2006), además de poder sufrir daños durante su transporte y comercialización. Todo ello puede afectar a sus atributos sensoriales e incidir en su calidad comercial originando importantes pérdidas. Así, dada su labilidad es recomendable conservarla en refrigeración, lo que no siempre garantiza que se mantenga su calidad.

Por ello, en este trabajo se planteó la aplicación de un recubrimiento de pectina y se evaluaron los cambios que se producen durante la conservación del fruto en condiciones de refrigeración. Se estudiaron diferentes parámetros: la acidez, la pérdida de humedad, el color y el crecimiento de mohos y levaduras.

Los recubrimientos se llevaron a cabo con las preparaciones de pectinas seleccionadas a partir de los resultados del estudio reológico: pectinas preparadas mediante agitador de varillas (AV), mediante placa magnética (PM) y ambos tratamientos con posterior aplicación de US al 30% de amplitud (AVUS y PMUS), con el fin de valorar el efecto del método utilizado para la preparación del gel. Según se pudo comprobar ese tratamiento de US daba lugar a geles con viscosidades menores. Además, se analizó la turbidez de las muestras de pectina utilizadas en los recubrimientos y se observó que presentan valores de absorbancia comprendidos entre 0,5 y 1,2, medidos a 480 nm, apreciándose una ligera disminución ($\approx 0,043$) tras la aplicación de US, lo cual podría resultar beneficioso a la hora de aplicar en alimentos ya sea como ingrediente adicional en un producto o como recubrimiento (Seshadri y col. 2003). Tras el recubrimiento, las fresas tenían una apariencia brillante y no alteraba el aspecto visual tal y como se puede ver en la siguiente imagen (Figura 24).

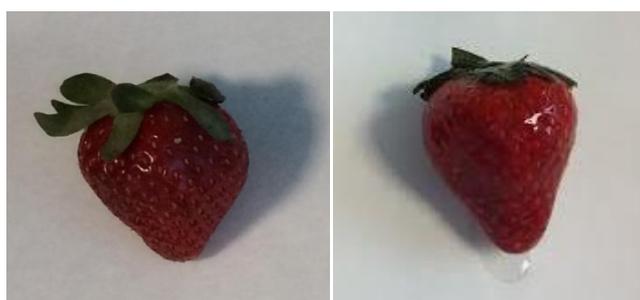


Figura 24 Comparación visual de una fresa sin recubrimiento (izquierda) y una fresa con recubrimiento de solución de pectina (derecha) formada por placa magnética

4.3.1 Estudio de la acidez

El ácido cítrico es el ácido más abundante en fresas seguido del ácido málico. Las fresas, además, contienen ácido ascórbico, importante biológicamente por su actividad antioxidante. La acidez total puede aumentar durante la fase de senescencia por la producción de ácido málico principalmente (García y col. 1998; Han y col. 2004; Velickova y col. 2013).

La variación de pH de las fresas en función del tiempo de almacenamiento se muestra en la Tabla 13. En general no se observaron grandes diferencias a lo largo del almacenamiento.

Tabla 13 Valores de pH obtenidos los diferentes días del almacenamiento de las fresas recubiertas de pectina

Pectinas	Tratamientos*	Día 0	Día 3	Día 5
	Control	3,34 ± 0,04	3,26 ± 0,00	3,39 ± 0,01
4400	PM	3,53 ± 0,01	3,35 ± 0,01	3,33 ± 0,01
	MS/PMUS	3,69 ± 0,01	3,27 ± 0,01	3,35 ± 0,00
	OS/AV	3,29 ± 0,11	3,59 ± 0,00	3,32 ± 0,01
	OS/AVUS	3,54 ± 0,01	3,57 ± 0,01	3,62 ± 0,00
4710	PM	3,80 ± 0,00	3,50 ± 0,01	3,44 ± 0,01
	MS/PMUS	3,52 ± 0,03	3,59 ± 0,00	3,71 ± 0,01
	AV	3,80 ± 0,01	3,54 ± 0,01	3,46 ± 0,01
	AVUS	3,63 ± 0,01	3,51 ± 0,01	3,49 ± 0,01

*Tratamientos: PM= placa magnética; PMUS= placa magnética + US (30%); AV= agitador de varillas; AVUS= agitador de varillas + US (30%)

Se ha visto en distintos estudios que los recubrimientos comestibles ralentizan la frecuencia respiratoria de las fresas y retrasan la utilización de los ácidos orgánicos en las reacciones enzimáticas. Esto puede ser probablemente porque la película formada con la pectina en la superficie de la fresa haya modificado la atmósfera interna (la concentración de CO₂ y O₂) retrasando la madurez del fruto (Han y col. 2004; Restrepo y col. 2010). Este efecto se puede ver en dos tipos de recubrimiento: en el gel 4400 AVUS, y el 4710 PMUS, en cuyos frutos la acidez disminuye con lo cual el recubrimiento pudiera estar controlando la senescencia del fruto.

4.3.2 Pérdida de humedad

El agua es el componente más abundante de los frutos, encontrándose en niveles comprendidos entre 86 y 94%. La fresa es una fruta muy susceptible a la rápida pérdida de agua por causa del deterioro del tejido (Velickova y col. 2013).

Como se sabe, la migración de agua de la fruta al ambiente es la causa principal de pérdida de peso de la fruta durante el almacenamiento. Los recubrimientos aportan una capa extra provocando una disminución en la transpiración y por tanto una reducción de esa pérdida de agua que implica un envejecimiento del fruto, disminución del peso y descenso de la calidad sensorial, afectando a la apariencia, textura y jugosidad del fruto (Jima 2015). En este trabajo, se llevó a cabo un seguimiento de la pérdida de peso debido a la pérdida de humedad durante 5 días para evaluar el efecto de los recubrimientos.

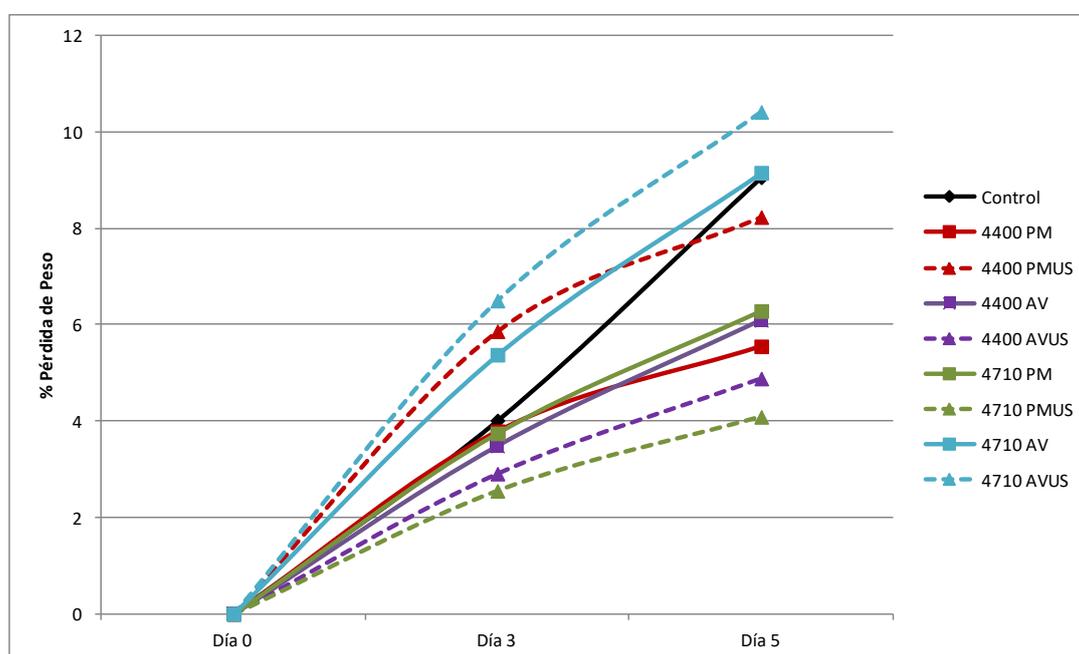


Figura 25 Evolución del porcentaje en la pérdida de peso en fresa sin recubrir (control) y recubiertas con los diferentes geles de pectina y almacenadas a 4 °C

En todos los tratamientos se observó una pérdida de peso progresiva con el paso del tiempo de almacenamiento (Figura 25), siendo la pérdida notablemente mayor en las fresas control y en las fresas recubiertas con la pectina 4710 AV y 4710 AVUS. Los recubrimientos que mejor protegieron frente a la pérdida de humedad fueron el 4400 AVUS y el 4710 PMUS, coincidiendo con los resultados de acidez.

Se puede confirmar que en la mayoría de los recubrimientos a base de la pectina 4400 y con la pectina 4710 preparada en placa magnética ejercen una acción barrera que mejora las pérdidas de humedad y por tanto contribuye al mantenimiento de la fresa. Estudios previos han demostrado una reducción en la pérdida de peso debido al efecto de la composición de diferentes recubrimientos a base de polisacáridos, como pectinas y alginato, que sirvieron de barrera semipermeable a la pérdida de humedad, reduciendo la respiración y evitando el intercambio de gases (Ayala-Zavala y col. 2013).

Nuestros resultados están también acordes con la publicación de Guerreiro y col. (2015) quienes recubrieron frambuesas mediante pectina observándose una disminución de la pérdida de humedad de las bayas recubiertas respecto a las bayas sin recubrimiento de pectina. Gol y col. (2013) demostraron una reducción de la pérdida de peso en fresas recubiertas de quitosano, que sirvió como barrera semipermeable al oxígeno y dióxido de carbono, reduciendo así la respiración, pérdida de agua y reacciones de oxidación.

4.3.3 Parámetros del color

Las modificaciones producidas en el color externo de la fresa durante el almacenamiento fueron analizadas mediante distintos parámetros: la luminosidad (L^*) y las coordenadas cromáticas a^* y b^* (Figura 26 y Tabla 14).

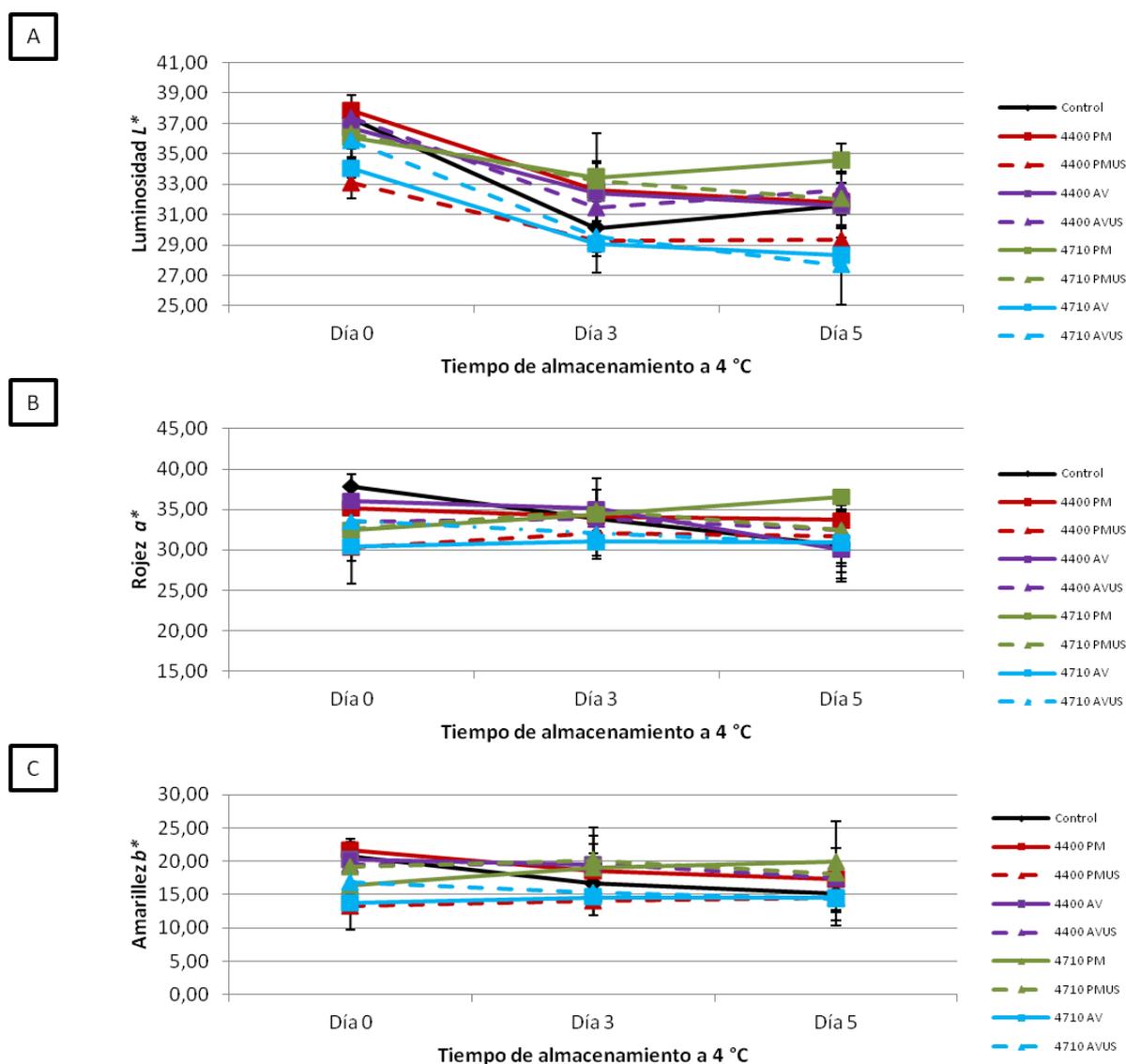


Figura 26 Evaluación de los parámetros de color L^* (A), a^* (B) y b^* (C), en fresa recubierta con pectina y en fresa sin recubrir, almacenadas durante 5 días a 4 °C

Según se puede observar en la Figura 26-A y en los datos de la Tabla 14, el parámetro L^* ($P < 0,05$), en líneas generales, sufrió un descenso, debido al oscurecimiento de la piel del fruto ($< L^*$) provocado por reacciones de oxidación y la pérdida de humedad que sufrieron las fresas durante el almacenamiento (Tanada-Palmu y col. 2005). No se encontraron grandes diferencias entre el grupo control y las muestras recubiertas, por lo que la aplicación de recubrimiento no afectó a la luminosidad de las fresas. Las fresas con recubrimientos 4400 AV, 4400 AVUS y 4400 PM y 4710 PM y 4710 PMUS, son las que presentaban mejores valores de luminosidad a partir del tercer día hasta el final del almacenamiento.

En cuanto a la coordenada cromática a^* (tonalidad rojiza de la epidermis de la fresa) (Figura 26-B), hay un efecto variable del tiempo no mostró una clara tendencia por el efecto tiempo ni por el efecto tratamiento. Sin embargo, a partir del día 3 se observó un notable descenso de este parámetro en la muestra control debido a una disminución en el enrojecimiento posiblemente por un aumento de la actividad respiratoria y enzimática que ocasiona pérdida de calidad por pardeamiento oxidativo (Restrepo y col. 2010).

Como se observa en la Figura 26-C, entre el inicio y el día 5 del almacenamiento, al igual que con el parámetro anterior, no se muestran claras tendencias en la coordenada cromática b^* (tonalidad amarilla de la epidermis en la fresa), si bien el control sí presentó la disminución más acusada.

En la Tabla 14 se recogen, además de los parámetros L^* , a^* y b^* , los valores de tono (h° , *hue angle*) (Figura 27), el Chroma (C^*) y las diferencias de color totales (ΔE^*) (Figura 28).

En cuanto al parámetro C^* es un valor que relaciona los parámetros de rojez (a^*), amarillez (b^*) y la luminosidad (L^*), puede ser sobre todo un indicador de la actividad enzimática, cuanto menor es el valor mayor actividad enzimática se ha producido. Se puede ver en el transcurso de los días cómo este valor va variando. En la Tabla 14 podemos observar como la muestra control es la que sufre una mayor disminución de este parámetro y las fresas con recubrimientos 4400 AVUS y 4710 PMUS de las que menos, corroborando lo que se vio también en la pérdida de humedad y en la disminución de la acidez.

Tabla 14 Parámetros de color de las fresas con los diferentes recubrimientos durante el almacenamiento

Muestra	L*	a*	b*	C*	h°
Día 0					
<i>Control</i>	37,33 ± 0,51	37,85 ± 1,54	20,82 ± 2,51	43,23 ± 2,17	28,75 ± 2,69
<i>4400 PM</i>	37,84 ± 0,99	35,21 ± 1,66	21,72 ± 1,60	41,38 ± 2,00	31,66 ± 1,58
<i>4400 PMUS</i>	33,07 ± 0,81	30,29 ± 4,44	13,34 ± 3,63	33,12 ± 5,54	23,49 ± 2,50
<i>4400 AV</i>	36,7 ± 1,39	36,10 ± 3,21	20,31 ± 1,75	41,44 ± 3,26	29,40 ± 2,36
<i>4400 AVUS</i>	37,36 ± 0,63	33,43 ± 2,30	19,55 ± 3,39	38,76 ± 3,67	30,14 ± 2,74
<i>4710 PM</i>	36,05 ± 0,44	32,49 ± 2,42	16,33 ± 3,87	36,43 ± 3,58	26,46 ± 4,12
<i>4710 PMUS</i>	36,31 ± 1,50	32,55 ± 0,20	19,14 ± 2,64	37,80 ± 1,44	30,38 ± 3,40
<i>4710 AV</i>	34,01 ± 0,61	30,41 ± 1,80	13,69 ± 1,33	33,36 ± 2,18	24,20 ± 0,79
<i>4710 AVUS</i>	35,82 ± 1,94	33,56 ± 2,10	16,86 ± 2,53	37,57 ± 2,97	26,57 ± 2,16
Día 3					
<i>Control</i>	30,10 ± 1,87	33,83 ± 0,83	16,69 ± 0,54	37,73 ± 0,52	26,26 ± 1,28
<i>4400 PM</i>	32,61 ± 0,14	34,13 ± 2,96	18,61 ± 2,52	38,88 ± 3,80	28,53 ± 1,26
<i>4400 PMUS</i>	29,26 ± 0,07	32,05 ± 2,83	14,1 ± 2,21	35,02 ± 3,48	23,65 ± 1,44
<i>4400 AV</i>	32,40 ± 2,13	35,09 ± 3,74	19,54 ± 3,00	40,19 ± 4,35	29,06 ± 2,89
<i>4400 AVUS</i>	31,44 ± 0,85	33,84 ± 0,89	19,65 ± 0,27	39,14 ± 0,70	30,16 ± 0,89
<i>4710 PM</i>	33,45 ± 2,89	34,38 ± 3,12	18,99 ± 4,86	39,35 ± 4,94	28,62 ± 4,25
<i>4710 PMUS</i>	33,21 ± 1,14	34,86 ± 2,53	20,18 ± 4,94	40,36 ± 4,62	29,73 ± 4,46
<i>4710 AV</i>	29,05 ± 0,53	31,02 ± 0,89	14,6 ± 1,50	34,31 ± 0,99	25,18 ± 2,39
<i>4710 AVUS</i>	29,52 ± 2,34	32,02 ± 3,13	15,33 ± 3,41	35,54 ± 4,20	25,38 ± 3,07
Día 5					
<i>Control</i>	31,56 ± 2,10	30,60 ± 2,62	15,15 ± 4,04	34,20 ± 4,15	26,03 ± 4,01
<i>4400 PM</i>	31,82 ± 0,86	33,68 ± 1,52	17,33 ± 1,77	34,20 ± 2,16	27,17 ± 1,29
<i>4400 PMUS</i>	29,33 ± 0,64	31,68 ± 3,29	14,5 ± 1,82	34,84 ± 3,75	24,56 ± 0,52
<i>4400 AV</i>	31,58 ± 1,47	30,04 ± 3,60	15,43 ± 3,08	33,79 ± 4,51	27,05 ± 2,38
<i>4400 AVUS</i>	32,64 ± 1,16	32,50 ± 1,79	17,44 ± 2,32	36,90 ± 2,68	28,13 ± 1,81
<i>4710 PM</i>	34,55 ± 0,39	36,59 ± 0,84	19,99 ± 6,01	41,90 ± 3,42	28,26 ± 7,05
<i>4710 PMUS</i>	32,02 ± 3,68	32,51 ± 1,24	18,18 ± 3,79	37,35 ± 2,06	29,07 ± 5,19
<i>4710 AV</i>	28,33 ± 0,72	30,95 ± 3,76	14,54 ± 2,16	34,20 ± 4,29	25,12 ± 1,13
<i>4710 AVUS</i>	27,66 ± 2,59	30,85 ± 4,73	14,38 ± 4,07	34,06 ± 6,01	24,67 ± 2,78

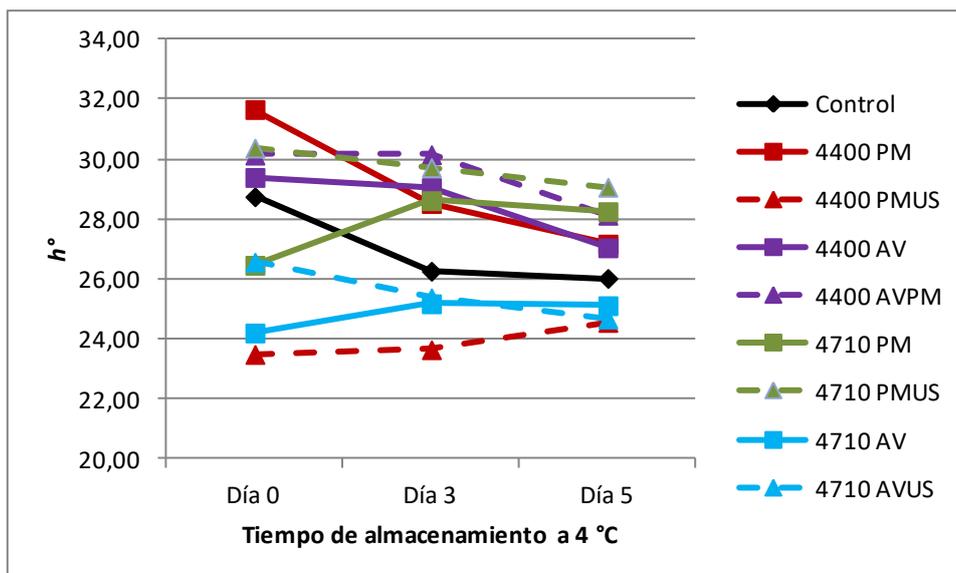


Figura 27 Variación del tono h° en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C

En líneas generales, el tono ($h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$) muestra un descenso durante el almacenamiento debido a la síntesis de antocianinas, un pigmento que contribuye al color rojizo de las fresas (Guerreiro y col. 2015). Las fresas con recubrimientos 4400 AV, 4400 AVUS y 4400 PM y 4710 PM, 4710 PMUS mostraron las mejores tonalidades durante el almacenamiento. Esto puede ser explicado como un retraso en la maduración/deterioro de la fruta (Han y col. 2004; Hernández-Muñoz y col. 2006). Estos valores coinciden con los resultados de luminosidad L^* , y, en parte con los de pérdida de humedad y acidez.

Respecto a ΔE (Figura 28), se observa que los recubrimientos presentan, en general, un mejor comportamiento respecto a los frutos control, teniendo una menor variación de color, sobre todo las fresas con los recubrimientos 4400 AVUS y 4710 PM, 4710 PMUS y 4710 AV, respecto a las fresas control. En todos los casos las diferencias de color es mayor en el control, esto puede explicarse debido a que, probablemente, los recubrimientos a base de pectina actúan como una barrera selectiva que impide la exposición del fruto al oxígeno ambiental, inhibiendo las posibles reacciones de oxidación, mientras que en los frutos control, el oscurecimiento de la parte externa (mayor ΔE) aumentó de manera progresiva, probablemente debido a la disminución del ácido ascórbico por su degradación en el tiempo, que propicia las reacciones de pardeamiento enzimático (Restrepo y col. 2010).

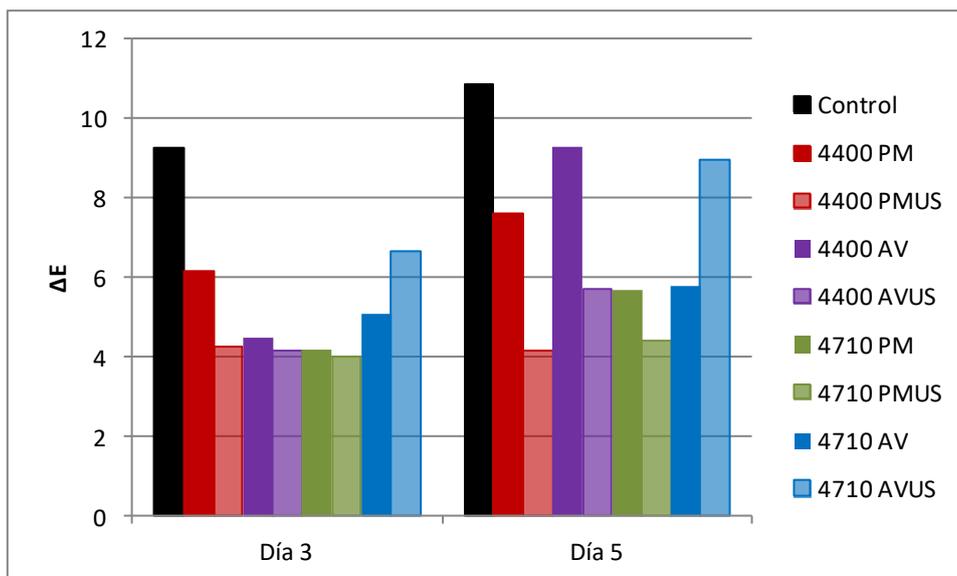


Figura 28 Variaciones de color de los distintos tratamientos en función del tiempo de almacenamiento

4.3.4 Análisis microbiológico

Con el propósito de evaluar el efecto de los distintos recubrimientos en su calidad microbiológica se llevó a cabo un análisis de mohos y levaduras. En la siguiente Figura 29 se muestran los resultados obtenidos tras el recuento microbiológico en las muestras tratadas con los distintos recubrimientos.

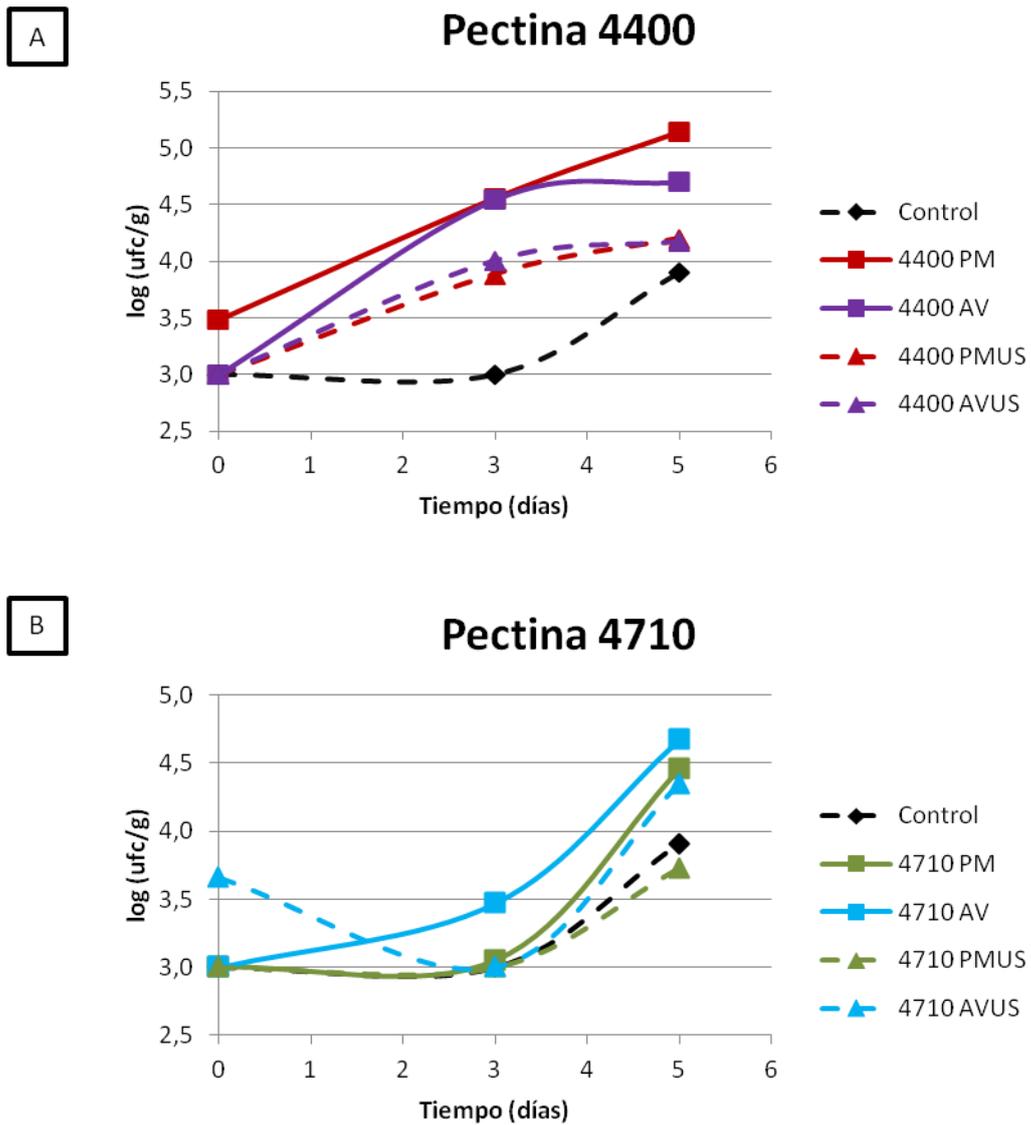


Figura 29 Crecimiento microbiológico en función del tiempo de almacenamiento

Como puede apreciarse, ningún tipo de recubrimiento condujo a un menor recuento microbiológico respecto al control. Esto podría explicarse por la manipulación recibida en la preparación de los distintos tipos de recubrimiento y tras el proceso de inmersión de la fresa con el recubrimiento, ya que no se realizó en condiciones asépticas. Las muestras de fresa recubierta que presentaron menores recuentos fueron la 4400 PM, 4400 AV, 4400 PMUS, 4400 AVUS y la 4710 PMUS, coincidiendo las dos últimas con los mejores datos referentes a la acidez, pérdida de humedad y algunos parámetros cromáticos.

5 CONCLUSIONES

- 1.- Se ha puesto a punto un método analítico mediante HPLC-ELSD que permite tanto la estimación de la masa molecular como la cuantificación del contenido en pectina y otros carbohidratos.
- 2.- La caracterización proximal y estructural (masa molecular, grado de esterificación, proporción de ácido galacturónico y azúcares neutros) y las propiedades térmicas y reológicas de las pectinas industriales analizadas están dentro de los estándares requeridos para pectinas comerciales empleadas como ingredientes alimentarios.
- 3.- Se ha detectado furosina en pectinas industriales por primera vez indicando, de forma preliminar, su utilidad como parámetro de calidad en las mismas.
- 4.- En la preparación de geles de pectina la aplicación de US de potencia modifica, dependiendo de las condiciones empleadas, los parámetros reológicos diversificando sus aplicaciones como ingrediente alimentario.
- 5.- Las muestras de fresa almacenadas en refrigeración con recubrimientos de pectina 4400 preparada con agitador de varillas y US, y la 4710 preparada con placa magnética y US, presentaron mejor calidad que las muestras control, atendiendo a los parámetros acidez, pérdida de humedad y color.

Aunque es preciso seguir profundizando, estos datos indican la idoneidad de la utilización de pectina, preparada con la asistencia de ultrasonidos, como recubrimiento de fresa para mejorar su calidad durante el periodo de vida útil.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Aoki, Takayoshi, Yuko Hiidome, Yasushi Sugimoto, Hisham R. Ibrahim, Yasuko Kato. 2001. "Modification of Ovalbumin with Oligogalacturonic Acids through the Maillard Reaction." *Food Research International* 34 (2–3): 127-132.
- Ayala-Zavala, Jesus Fernando, B. A. Silva-Espinoza, M. R. Cruz-Valenzuela, J. M. Leyva, L. A. Ortega-Ramírez, D. K. Carrasco-Lugo, J. J. Pérez-Carlón, B. G. Melgarejo-Flores, G. A. González-Aguilar, M. R. A. Miranda. 2013. "Pectin Cinnamon Leaf Oil Coatings Add Antioxidant and Antibacterial Properties to Fresh-Cut Peach." *Flavour and Fragrance Journal* 28 (1): 39-45.
- Baier, Mathias. 1994. "Pectin Changes in Samples Containing Poplar Cambium and Inner Bark in Relation to the Seasonal Cycle." *An International Journal of Plant Biology* 193 (3): 446-454.
- Bello-Lara, Juan Esteban, Rosendo Balois-Morales, María Teresa Sumaya-Martínez, Porfilio Juárez-López, Adriana Inés Rodríguez-Hernández, Leticia Mónica Sánchez-Herrera, Edgar Iván Jiménez-Ruiz. 2014. "Extraction and Rheological Characterization of Starch and Pectin in "Pera" (*Musa ABB*) Banana Fruits." *Revista Mexicana En Ciencias Agrícolas* 8: 1501-1507.
- Boonrod, Dennapa, Kamonradand Reanma, Hataichanoke Niamsup. 2006. "Extraction and Physicochemical Characteristics of Acid-Soluble Pectin from Raw Papaya (*Carica Papaya*) Peel." *Chiang Mai Journal Sciences* 3 (1): 129-135.
- Brejholt, S. M. 2010. "Pectins." In *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*, 237-262.
- Caffall, Kerry Hosmer Debra Mohnen. 2009. "The Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Wall Pectic Polysaccharides." *Carbohydrate Research* 344 (14): 1879-1900.
- Chaires M., Leandro, Emma G. Ramos R., Juan A. Salazar M. 1993. "Caracterización Físico-Química De Pectinas De Cáscara De Tuna Y Su Posible Uso En La Industria Alimentaria."
- Chasquibol, Silva, Nancy, Benites Arroyo Edmundo, Gomero Morales Juan Carlos. 2008. "Extracción Y Caracterización De Pectinas Obtenidas a Partir De Frutos De La Biodiversidad Peruana." *Ingeniería Industrial Universidad De Lima* 26: 175-199.
- Chen, Jun, Rui-hong Liang, Wei Liu, Ti Li, Cheng-mei Liu, Shuang-shuang Wu, Zhao-jun Wang. 2013. "Pectic-Oligosaccharides Prepared by Dynamic High-Pressure Microfluidization and their in Vitro Fermentation Properties." *Carbohydrate Polymers* 91 (1): 175-182.
- Chen, Qun, Zhuoyan Hu, Fiona Yan-Dong Yao, Hanhua Liang. 2016. "Study of Two-Stage Microwave Extraction of Essential Oil and Pectin from Pomelo Peels." *LWT - Food Science and Technology* 66: 538-545.
- Combo, Agnan Marie Michel, Mario Aguedo, Nicolas Quiévy, Sabine Danthine, Dorothée Goffin, Nicolas Jacquet, Christophe Blecker, Jacques Devaux, Michel Paquot. 2013. "Characterization of Sugar Beet Pectic-Derived Oligosaccharides obtained by Enzymatic Hydrolysis." *International Journal of Biological Macromolecules* 52: 148-156.
- Condezo-Hoyos, Luis, Elena Pérez-López, Pilar Rupérez. 2015. "Improved Evaporative Light Scattering Detection for Carbohydrate Analysis." *Food Chemistry* 180: 265-271.
- Corzo-Martínez, M., N. Corzo, M. Villamiel, M. D. del Castillo. 2012. "4. Browning Reactions." In *Food Biochemistry and Food Processing*, edited by Hui, Y.H. Associate editors: W.K. Nip, L.M.L. Mollet, G. Pañiyath and B.K. Simpson Blackwell Publishing. Iowa, USA.
- Di Pierro, P., L. Mariniello, C. V. L. Giosafatto, P. Masi, R. Porta. 2005. "Solubility and Permeability Properties of Edible Petin-Soy Flour Films obtained in the Absence Or Presence of Transglutaminase." *Food Biotechnology* 19: 37-49.
- Donghong, Liu, Zhang Lifen, Xu Yuting, Zhang Xiangzhong. 2013. "Chemical and Non-Medical Biological Effects of Ultrasound." *Proceedings of Meetings on Acoustics* 19.
- Drusch, Stephan. 2007. "Sugar Beet Pectin: A Novel Emulsifying Wall Component for Microencapsulation of Lipophilic Food Ingredients by Spray-Drying." *Food Hydrocolloids* 21 (7): 1223-1228.

6 | BIBLIOGRAFÍA

- Dvořáčková, Eva, Marie Šnóbllová, Petr Hrdlička. 2014. "Carbohydrate Analysis: From Sample Preparation to HPLC on Different Stationary Phases Coupled with Evaporative Light-Scattering Detection." *Journal of Separation Science* 37 (4): 323-337.
- Einhorn-Stoll, U., H. Kastner, S. Drusch. 2014. "Thermally Induced Degradation of Citrus Pectins during Storage – Alterations in Molecular Structure, Colour and Thermal Analysis." *Food Hydrocolloids* 35: 565-575.
- Einhorn-Stoll, Ulrike, Hyeo Hatakeyama, Tatsuko Hatakeyama. 2012. "Influence of Pectin Modification on Water Binding Properties." *Food Hydrocolloids* 27 (2): 494-502.
- Einhorn-Stoll, Ulrike, Herbert Kunzek, Gerhard Dongowski. 2007. "Thermal Analysis of Chemically and Mechanically Modified Pectins." *Food Hydrocolloids* 21 (7): 1101-1112.
- Eliaza, Isaac, Elaine Weila, Barry Wilk. 2007. "Integrative Medicine and the Role of Modified Citrus Pectin/Alginates in Heavy Metal Chelation and Detoxification – Five Case Reports." *Forsch Komplementärmed* 14: 358-364.
- Espitia, Paula Judith Pérez, Wen-Xian Du, Roberto de Jesús Avena-Bustillos, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Tara H. McHugh. 2014. "Edible Films from Pectin: Physical-Mechanical and Antimicrobial Properties - A Review." *Food Hydrocolloids* 35: 287-296.
- Fishman, Marshall L., Hoa K. Chau, Peter D. Hoagland, Arland T. Hotchkiss. 2006. "Microwave-Assisted Extraction of Lime Pectin." *Food Hydrocolloids* 20 (8): 1170-1177.
- Freitas de Oliveira, Cibele, Diego Giordani, Rafael Lutkemier, Poliana Deyse Gurak, Florencia Cladera-Olivera, Ligia Damasceno Ferreira Marczak. 2016. "Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel Assisted by Ultrasound." *LWT - Food Science and Technology* 71: 110-115.
- Galant, Ashley L., Gary A. Luzio, Wilbur W. Widmer, Randall G. Cameron. 2014. "Compositional and Structural Characterization of Pectic Material from Frozen Concentrated Orange Juice." *Food Hydrocolloids* 35: 661-669.
- Gamboa-Santos, Juliana, Ana C. Soria, Tiziana Fornari, Mar Villamiel, Antonia Montilla. 2013. "Optimisation of Convective Drying of Carrots using Selected Processing and Quality Indicators." *International Journal of Food Science & Technology* 48 (10): 1998-2006.
- García, Montoya, Camila, Gómez Penagos Elena. 2011. "El Entorno Comercial De La Pectina En La Industria Alimentaria Antioqueña." *Escuela De Ingeniería De Antioquia*.
- Garna, Haikel, Nicolas Mabon, Bernard Wathelet, Michel Paquot. 2004. "New Method for a Two-Step Hydrolysis and Chromatographic Analysis of Pectin Neutral Sugar Chains." *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 52 (15): 4652-4659.
- Garna, Haikel, Nicolas Mabon, Katherine Nott, Bernard Wathelet, Michel Paquot. 2006. "Kinetic of the Hydrolysis of Pectin Galacturonic Acid Chains and Quantification by Ionic Chromatography." *Food Chemistry* 96 (3): 477-484.
- Georgiev, Yordan, Manol Ognyanov, Irina Yanakieva, Veselin Kussovski, Maria Kratchanova. 2012. "Isolation, Characterization and Modification of Citrus Pectins." *Journal of Bioscience and Biotechnology* 1 (3): 223-233.
- Giosafatto, C. Valeria L., Prospero Di Pierro, Patrick Gunning, Alan Mackie, Raffaele Porta, Loredana Mariniello. 2014. "Characterization of Citrus Pectin Edible Films Containing Transglutaminase-Modified Phaseolin." *Carbohydrate Polymers* 106: 200-208.
- Gol, Neeta B., Pooja R. Patel, T. V. Ramana Rao. 2013. "Improvement of Quality and Shelf-Life of Strawberries with Edible Coatings Enriched with Chitosan." *Postharvest Biology and Technology* 85: 185-195.
- Gómez, Belén, Beatriz Gullón, Remedios Yáñez, Henk Schols, José L. Alonso. 2016. "Prebiotic Potential of Pectins and Pectic Oligosaccharides Derived from Lemon Peel Wastes and Sugar Beet Pulp: A Comparative Evaluation." *Journal of Functional Foods* 20: 108-121.
- Gorrasi, Giuliana Valeria Bugatti. 2016. "Edible Bio-Nano-Hybrid Coatings for Food Protection Based on Pectins and LDH-Salicylate: Preparation and Analysis of Physical Properties." *LWT - Food Science and Technology* 69: 139-145.

6 | BIBLIOGRAFÍA

- Grassino, Antonela Ninčević, Mladen Brnčić, Dražen Vikić-Topić, Sunčica Roca, Maja Dent, Suzana Rimac Brnčić. 2016. "Ultrasound Assisted Extraction and Characterization of Pectin from Tomato Waste." *Food Chemistry* 198: 93-100.
- Guerreiro, Adriana C., Custódia M. L. Gago, Maria L. Faleiro, Maria G. C. Miguel, Maria D. C. Antunes. 2015a. "Raspberry Fresh Fruit Quality as Affected by Pectin- and Alginate-Based Edible Coatings Enriched with Essential Oils." *Scientia Horticulturae* 194: 138-146.
- Guerreiro, Adriana C., Custódia M. L. Gago, Maria L. Faleiro, Maria G. C. Miguel, Maria D. C. Antunes. 2015b. "The use of Polysaccharide-Based Edible Coatings Enriched with Essential Oils to Improve Shelf-Life of Strawberries." *Postharvest Biology and Technology* 110: 51-60.
- Gullón, B., B. Gómez, M. Martínez-Sabajanes, R. Yáñez, J. C. Parajó, J. L. Alonso. 2013. "Pectic Oligosaccharides: Manufacture and Functional Properties." *Trends in Food Science & Technology* 30 (2): 153-161.
- Gullón, Beatriz, Patricia Gullón, Yolanda Sanz, José Luis Alonso, J. C. Parajó. 2011. "Prebiotic Potential of a Refined Product Containing Pectic Oligosaccharides." *LWT - Food Science and Technology* 44 (8): 1687-1696.
- Habibi, Y., A. Heyraud, M. Mahrouz, M. R. Vignon. 2004. "Structural Features of Pectic Polysaccharides from the Skin of Opuntia Ficus-Indica Prickly Pear Fruits." *Carbohydrate Research* 339 (6): 1119-1127.
- Han, C., Y. Zhao, S. W. Leonard, M. G. Traber. 2004. "Edible Coatings to Improve Storability and Enhance Nutritional Value of Fresh and Frozen Strawberries (*Fragaria × Ananassa*) and Raspberries (*Rubus Ideaus*)." *Postharvest Biology and Technology* 33 (1): 67-78.
- Hernández-Muñoz, Pilar, Eva Almenar, María José Ocio, Rafael Gavara. 2006. "Effect of Calcium Dips and Chitosan Coatings on Postharvest Life of Strawberries (*Fragaria X Ananassa*)." *Postharvest Biology and Technology* 39 (3): 247-253.
- Holck, Jesper, Arland T. Hotchkiss, Anne S. Meyer, Jørn D. Mikkelsen, Robert A. Rastall. 2014. "Production and Bioactivity of Pectic Oligosaccharides from Fruit and Vegetable Biomass." In *Food Oligosaccharides*, 76-87: John Wiley & Sons, Ltd.
- Holzwarth, Melanie, Julia Wittig, Reinhold Carle, Dietmar R. Kammerer. 2013. "Influence of Putative Polyphenoloxidase (PPO) Inhibitors on Strawberry (*Fragaria X Ananassa* Duch.) PPO, Anthocyanin and Color Stability of Stored Purées." *LWT - Food Science and Technology* 52 (2): 116-122.
- Jacobasch, Gisela, Gerhard Dongowski, Simone Florian, Katrin Müller-Schmeh, Barbara Raab, Detlef Schmiedl. 2008. "Pectin does Not Inhibit Intestinal Carcinogenesis in APC-Deficient Min/+Mice." *Jornal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1501-1510.
- Johannes Coenen, Gerardus. 2007. "Structural Characterization of Native Pectins."
- Kang, H. J., C. Jo, J. H. Kwon, J. H. Kim, H. J. Chung, M. W. Byun. 2007. "Effect of a Pectin-Based Edible Coating Containing Green Tea Powder on the Quality of Irradiated Pork Patty." *Food Control* 18 (5): 430-435.
- Karaki, Nadine, Abdulhadi Aljawish, Lionel Muniglia, Catherine Humeau, Jordane Jasniewski. 2016. "Physicochemical Characterization of Pectin Grafted with Exogenous Phenols." *Food Hydrocolloids* 60: 486-493.
- Kartel, Mykola T., Lidiya A. Kupchic, Batyr K. Veisov. 1999. "Evaluation of Pectin Binding of Heavy Metal Ions in Aqueous Solutions." *Chemosphere* 38 (11): 2591-2596.
- Kashappa, G. H. Desai. 2005. "Preparation and Characteristics of High-Amilose Corn Starch/Pectin Blend Micriparticles: A Technical Note." *AAPS PharmSciTech* 6 (2): E202-E208.
- Kratchanova, M., E. Pavlova, I. Panchev. 2004. "The Effect of Microwave Heating of Fresh Orange Peels on the Fruit Tissue and Quality of Extracted Pectin." *Carbohydrate Polymers* 56 (2): 181-185.
- Laufenberg, Günther, Benno Kunz, Marianne Nystroem. 2003. "Transformation of Vegetable Waste into Value Added Products:: (A) the Upgrading Concept; (B) Practical Implementations." *Bioresource Technology* 87 (2): 167-198.

6 | BIBLIOGRAFÍA

- Laurent, M. A. P. Boulenguer. 2003. "Stabilization Mechanism of Acid Dairy Drinks (ADD) Induced by Pectin." *Food Hydrocolloids* 17 (4): 445-454.
- Leroux, J., V. Langendorff, G. Schick, V. Vaishnav, J. Mazoyer. 2003. "Emulsion Stabilizing Properties of Pectin." *Food Hydrocolloids* 17 (4): 455-462.
- Levigne, Sébastien, Marie-Christine Ralet, Jean-François Thibault. 2002. "Characterisation of Pectins Extracted from Fresh Sugar Beet Under Different Conditions using an Experimental Design." *Carbohydrate Polymers* 49 (2): 145-153.
- Liu, LinShu, Marshall L. Fishman, Joseph Kost, Kevin B. Hicks. 2003. "Pectin-Based Systems for Colon-Specific Drug Delivery Via Oral Route." *Biomaterials* 24 (19): 3333-3343.
- López Hernández, J., M. J. González-Castro, I. Naya Alba, de la Cruz García, C. 1998. "High-Performace Liquid Chromatographic Determination of Mono- and Oligosaccharides in Vegetables with Evaporative Light-Scattering Detection and Refractive Index Detection." *Journal of Chromatography Sciences* 36 (6): 293-298.
- Manrique, Guillermo D. Franco M. Lajolo. 2002. "FT-IR Spectroscopy as a Tool for Measuring Degree of Methyl Esterification in Pectins Isolated from Ripening Papaya Fruit." *Postharvest Biology and Technology* 25 (1): 99-107.
- Marcotte, Michèle, Ali R. Taherian Hoshahili, H. S. Ramaswamy. 2001. "Rheological Properties of Selected Hydrocolloids as a Function of Concentration and Temperature." *Food Research International* 34 (8): 695-703.
- Marín, Francisco R., Cristina Soler-Rivas, Obdulio Benavente-García, Julian Castillo, José A. Pérez-Alvarez. 2007. "By-Products from Different Citrus Processes as a Source of Customized Functional Fibres." *Food Chemistry* 100 (2): 736-741.
- Masmoudi, Manel, Souhail Besbes, Moncef Chaabouni, Christelle Robert, Michel Paquot, Christophe Blecker, Hamadi Attia. 2008. "Optimization of Pectin Extraction from Lemon by-Product with Acidified Date Juice using Response Surface Methodology." *Carbohydrate Polymers* 74 (2): 185-192.
- Matsunaga, T. T. Ishii. 2004. "Characterization of Metal Binding Properties of Rhamnogalacturonan II from Plant Cell Walls by Size-Exclusion HPLC/ICP-MS." *Analytical Sciences* 20: 1389-1393.
- Maxwell, Ellen G., Ian J. Colquhoun, Hoa K. Chau, Arland T. Hotchkiss, Keith W. Waldron, Victor J. Morris, Nigel J. Belshaw. 2016. "Modified Sugar Beet Pectin Induces Apoptosis of Colon Cancer Cells Via an Interaction with the Neutral Sugar Side-Chains." *Carbohydrate Polymers* 136: 923-929.
- Megías-Pérez, Roberto, Juliana Gamboa-Santos, Ana Cristina Soria, Mar Villamiel, Antonia Montilla. 2014. "Survey of Quality Indicators in Commercial Dehydrated Fruits." *Food Chemistry* 150: 41-48.
- Methacanon, Pawadee, Jaruwan Kongsin, Chaiwut Gamonpilas. 2014. "Pomelo (Citrus Maxima) Pectin: Effects of Extraction Parameters And its Properties." *Food Hydrocolloids* 35: 383-391.
- Miceli-Garcia, Lucia G. 2014. "Pectin from Apple Pomace: Extraction, Characterization and Utilization in Encapsulating Alpha-Tocopherol Acetate."
- Mohnen, Debra. 2008. "Pectin Structure and Biosynthesis." *Current Opinion in Plant Biology* 11 (3): 266-277.
- Monfregola, Luca, Valeria Bugatti, Stefania De Luca Amodeo, Vittoria Vittoria. 2011. "Physical and Water Sorption Properties of Chemically Modified Pectin with an Environmentally Friendly Process." *Biomacromolecules* 12: 2311-2318.
- Monge, Maria Eugenia, R. Martín Negri, Adriana A. Kolender, Rosa Erra-Balsells. 2007. "Structural Characterization of Native High-Methoxylated Pectin using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Comparative use of 2,5-Dihydroxybenzoic Acid and nor-Harmane as UV-MALDI Matrices." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 2638-2646.
- Moorthy, I. Ganesh, J. Prakash Maran, S. Ilakya, S. L. Anitha, S. Pooja Sabarima, B. Priya. 2017. "Ultrasound Assisted Extraction of Pectin from Waste Artocarpus Heterophyllus Fruit Peel." *Ultrasonics Sonochemistry* 34: 525-530.

6 | BIBLIOGRAFÍA

- Moreno, Rodrigo. 2005. "Reología De Suspensiones Cerámicas." In Consejo Superior de Investigaciones Científicas ed., 27-71.
- Morris, Victor J., Nigel J. Belshaw, Keith W. Waldron, Ellen G. Maxwell. 2013. "The Bioactivity of Modified Pectin Fragments." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1 (1): 21-37.
- Muñoz, Ordoñez, Francisco J. 2011. "Extracción Y Caracterización De La Pectina Obtenida a Partir Del Fruto De Dos Ecotipos De Cocona (*Solanum sessiliflorum*), En Diferentes Grados De Madurez; a Nivel De Planta Piloto."
- Ngouémazong, Eugénie D., Stefanie Christiaens, Avi Shpigelman, Ann Van Loey, Marc Hendrickx. 2015. "The Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Pectin: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 705.
- Novosel'skaya, IL, NL Voropaeva, LN Semenova, S. Sh Rashidova. 2000. "Trends in the Science and Applications of Pectins." *Chemistry of Natural Compounds* 36 (1): 1-10.
- O'Shea, N., A. Ktenioudaki, T. P. Smyth, P. McLoughlin, L. Doran, M. A. E. Auty, E. Arendt, E. Gallagher. 2015. "Physicochemical Assessment of Two Fruit by-Products as Functional Ingredients: Apple and Orange Pomace." *Journal of Food Engineering* 153: 89-95.
- O'Shea, Norah, Elke K. Arendt, Eimear Gallagher. 2012. "Dietary Fibre and Phytochemical Characteristics of Fruit and Vegetable by-Products and their Recent Applications as Novel Ingredients in Food Products." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 16: 1-10.
- Olano-Martin, Estibaliz, Mark R. Williams, Glenn R. Gibson, Robert A. Rastall. 2003. "Pectins and Pectic-Oligosaccharides Inhibit Escherichia Coli O157:H7 Shiga Toxin as Directed Towards the Human Colonic Cell Line HT29." *FEMS Microbiology Letters* 218 (1): 101-105.
- Osorio, Coralia, José Carriazo, Helber Barbosa. 2011. "Thermal and Structural Study of Guava (*Psidium Guajava* L) Powders obtained by Two Dehydration Methods." *Quimica Nova* 34.
- Pagán, Jordi, Alberto Ibarz, Miguel Llorca, Luis Coll. 1999. "Quality of Industrial Pectin Extracted from Peach Pomace at Different pH and Temperatures." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (7): 1038-1042.
- Panouillé, Maud, Jean-François Thibault, Estelle Bonnin. 2006. "Cellulase and Protease Preparations can Extract Pectins from various Plant Byproducts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23): 8926-8935.
- Pellerin, P. M. A. O'Neill. 1998. "The Interaction of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II with Heavy Metals and Lanthanides in Wines and Fruit Juices." *Analisis Magazine* 26 (6): M 32- M 36.
- Pinheiro, Eloísa Rovaris, Iolanda M. D. A. Silva, Luciano V. Gonzaga, Edna R. Amante, Reinaldo F. Teófilo, Márcia M. C. Ferreira, Renata D. M. C. Amboni. 2008. "Optimization of Extraction of High-Ester Pectin from Passion Fruit Peel (*Passiflora Edulis* Flavicarpa) with Citric Acid by using Response Surface Methodology." *Bioresource Technology* 99 (13): 5561-5566.
- Popov, S. V., Yu S. Ovodov. 2013. "Polypotency of the Immunomodulatory Effect of Pectins." *Biochemistry (Moscow)* 78 (7): 1053-1067.
- Restrepo F., Jorge I., Iván D. Aristizábal T. 2010. "CONSERVATION OF STRAWBERRY (*Fragaria X Ananassa* Duch Cv. Camarosa) BY EDIBLE COATING APPLICATION OF SABILA GEL MUCILAGE (*Aloe Barbadensis* Miller) AND CARNAUBA WAX." *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica* 17 (3): 252-263.
- Ridley, Brent L., Malcolm A. O'Neill, Debra Mohnen. 2001. "Pectins: Structure, Biosynthesis, and Oligogalacturonide-Related Signaling." *Phytochemistry* 57 (6): 929-967.
- Rolin, C. 2002. *Commercial Pectins Preparation in: Pectins and their Manipulation*, edited by G. B. Seymour, J. P. Knox CRC Press:.
- Ruiz-Matute, A. I., O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M. L. Sanz, I. Martínez-Castro. 2011. "Derivatization of Carbohydrates for GC and GC-MS Analyses." *Journal of Chromatography B* 879 (17-18): 1226-1240.

6 | BIBLIOGRAFÍA

- Sansone, Francesca, Teresa Mencherini, Patrizia Picerno, Matteo d'Amore, Rita Patrizia Aquino, Maria Rosaria Lauro. 2011. "Maltodextrin/Pectin Microparticles by Spray Drying as Carrier for Nutraceutical Extracts." *Journal of Food Engineering* 105 (3): 468-476.
- Seshadri, Rahul, Jochen Weiss, Greg J. Hulbert, John Mount. 2003a. "Ultrasonic Processing Influences Rheological and Optical Properties of High-Methoxyl Pectin Dispersions." *Food Hydrocolloids* 17 (2): 191-197.
- Sharma, B. R., L. Naresh, N. C. Dhuldhoya, S. U. Merchant, Merchant U.C. 2006. "An Overview on Pectins." *Times Food Processing Journal*: 44-51.
- Silvia, Salato, Gloria. 2006. "Modificaciones En La Composición De La Pared Celular De Frutos De Cerezo Dulce (*Prunus Avium* L.): Incidencia Del Estado Ontogénico Y Del Cultivar."
- Singthong, Jittra, Steve W. Cui, Suwayd Ningsanond, H. Douglas Goff. 2004. "Structural Characterization, Degree of Esterification and some Gelling Properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos Pareira*) Pectin." *Carbohydrate Polymers* 58 (4): 391-400.
- Sinha, V. R. Rachna Kumria. 2001. "Polysaccharides in Colon-Specific Drug Delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 224 (1-2): 19-38.
- Sriamornsak, Pornsak. 2016. "Chemistry of Pectin and its Pharmaceutical Uses: A Review." *ResearchGate*.
- Stephen, Alistair M. Phillips, Glyn O., Williams, Peter A. 2006. *Food Polysaccharides and their Applications*. Segunda Edición ed. Advirosoy Board.
- Tanada-Palmu, Patrícia S. Carlos R. F. Grosso. 2005. "Effect of Edible Wheat Gluten-Based Films and Coatings on Refrigerated Strawberry (*Fragaria Ananassa*) Quality." *Postharvest Biology and Technology* 36 (2): 199-208.
- Terol, Amanda. 2012. "Desarrollo De La Cromatografía De Líquidos a Alta Temperatura Y De Microondas Para El Análisis De Alimentos."
- Thakur, Beli R., Rakesh K. Singh, Avtar K. Handa, M. A. Rao. 1997. "Chemistry and Uses of Pectin - A Review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37 (1): 47-73.
- Thibault, Jean-François, Catherine M. G. C. Renard, Monique A. V. Axelos, Philippe Roger, Marie-Jeanne Crépeau. 1993. "Studies of the Length of Homogalacturonic Regions in Pectins by Acid Hydrolysis." *Carbohydrate Research* 238: 271-286.
- Vandamme, Th F., A. Lenourry, C. Charrueau, J-C Chaumeil. 2002. "The use of Polysaccharides to Target Drugs to the Colon." *Carbohydrate Polymers* 48 (3): 219-231.
- Velickova, Elena, Eleonora Winkelhausen, Slobodanka Kuzmanova, Vitor D. Alves, Margarida Moldão-Martins. 2013. "Impact of Chitosan-Beeswax Edible Coatings on the Quality of Fresh Strawberries (*Fragaria Ananassa* Cv Camarosa) Under Commercial Storage Conditions." *LWT - Food Science and Technology* 52 (2): 80-92.
- Vos, Arjan P., Monique Haarman, Jan-Willem H. VanGinkel, Jan Knol, Johan Garssen, Bernd Stahl, Guenther Boehm, Laura M'Rabet. 2007. "Dietary Supplementation of Neutral and Acidic Oligosaccharides Enhances Th1-Dependent Vaccination Responses in Mice." *Pediatric Allergy and Immunology* 18 (4): 304-312.
- Vriesmann, Lúcia C. Carmen L. O. Petkowicz. 2013. "Highly Acetylated Pectin from Cacao Pod Husks (*Theobroma Cacao* L.) Forms Gel." *Food Hydrocolloids* 33 (1): 58-65.
- Wakerly, Z., J. T. Fell, D. Attwood, D. Parkins. 1996. "Pectin/Ethylcellulose Film Coating Formulations for Colonic Drug Delivery." *Pharmaceutical Research* 13: 1210-1212.
- Wang, Sijin, Fang Chen, Jihong Wu, Zhengfu Wang, Xiaojun Liao, Xiaosong Hu. 2007. "Optimization of Pectin Extraction Assisted by Microwave from Apple Pomace using Response Surface Methodology." *Journal of Food Engineering* 78 (2): 693-700.

6 | BIBLIOGRAFÍA

- Wang, Wenjun, Xiaobin Ma, Yuting Xu, Yongqiang Cao, Zhumao Jiang, Tian Ding, Xingqian Ye, Donghong Liu. 2015. "Ultrasound-Assisted Heating Extraction of Pectin from Grapefruit Peel: Optimization and Comparison with the Conventional Method." *Food Chemistry* 178: 106-114.
- Wang, Xin, Xin Lü. 2014. "Characterization of Pectic Polysaccharides Extracted from Apple Pomace by Hot-Compressed Water." *Carbohydrate Polymers* 102: 174-184.
- Wikiera, Agnieszka, Magdalena Mika, Anna Starzyńska-Janiszewska, Bożena Stodolak. 2015. "Development of Complete Hydrolysis of Pectins from Apple Pomace." *Food Chemistry* 172: 675-680.
- Wikiera, Agnieszka, Magdalena Mika, Anna Starzyńska-Janiszewska, Bożena Stodolak. 2016. "Endo-Xylanase and Endo-Cellulase-Assisted Extraction of Pectin from Apple Pomace." *Carbohydrate Polymers* 142: 199-205.
- Wong, Tin Wui, Gaia Colombo, Fabio Sonvico. 2011. "Pectin Matrix as Oral Drug Delivery Vehicle for Colon Cancer Treatment." *AAPS PharmSciTech* 12: 201-214.
- Yapo, Beda M. 2009a. "Biochemical Characteristics and Gelling Capacity of Pectin from Yellow Passion Fruit Rind as Affected by Acid Extractant Nature." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (4): 1572-1578.
- Yapo, Beda M. 2009b. "Lemon Juice Improves the Extractability and Quality Characteristics of Pectin from Yellow Passion Fruit by-Product as Compared with Commercial Citric Acid Extractant." *Bioresource Technology* 100 (12): 3147-3151.
- Zhang, L., X. Ye, SJ Xue, X. Zhang, D. Liu, R. Meng, S. Chen. 2013a. "Effect of High-Intensity Ultrasound on the Physicochemical Properties and Nanostructure of Citrus Pectin." *Journal of the Science of the Food and Agriculture* 8: 2028-2036.
- Zhang, Lifan, Xinqian Ye, Tian Ding, Xiaoyang Sun, Yuting Xu, Donghong Liu. 2013b. "Ultrasound Effects on the Degradation Kinetics, Structure and Rheological Properties of Apple Pectin." *Ultrasonics Sonochemistry* 20 (1): 222-231.
- Zhang, Lifan, Xianzhong Zhang, Donghong Liu, Tian Ding, Xingqian Ye. 2015. "Effect of Degradation Methods on the Structural Properties of Citrus Pectin." *LWT - Food Science and Technology* 61 (2): 630-637.
- Zhang, Wenbo, Ping Xu, Han Zhang. 2015. "Pectin in Cancer Therapy: A Review." *Trends in Food Science & Technology* 44 (2): 258-271.
- Zhongdong, Liu, Wei Guohua, Guo Yunchang, John F. Kennedy. 2006. "Image Study of Pectin Extraction from Orange Skin Assisted by Microwave." *Carbohydrate Polymers* 64 (4): 548-552.