

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA



**"EVALUACION DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DE
PECTINA EN AGUAS MIELES DEL BENEFICIADO DE CAFÉ
PROCEDENTES DE DESMUCILAGINADO MECANICO"**

PRESENTADO POR:

JESSICA IVETTE GARCÍA PALMA

PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERA QUÍMICO

CIUDAD UNIVERSITARIA, ENERO DE 2009

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR :

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL :

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

DECANO :

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIO :

ING. OSCAR EDUARDO MARROQUÍN HERNÁNDEZ

ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA

DIRECTOR :

ING. FERNANDO TEODORO RAMÍREZ ZELAYA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

Trabajo de Graduación previo a la opción al Grado de:
INGENIERA QUÍMICO

Título

:

**"EVALUACION DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DE PECTINA EN
AGUAS MIELES DEL BENEFICIADO DE CAFÉ PROCEDENTES DE
DESMUCILAGINADO MECANICO"**

Presentado por

:

JESSICA IVETTE GARCÍA PALMA

Trabajo de Graduación Aprobado por :

Docentes Directores

:

**MSc. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA
Inga. SARA ELISABETH ORELLANA CLAROS**

Docente Director Externo

:

Dr. ADÁN HERNÁNDEZ

San Salvador, Enero de 2009

Trabajo de Graduación Aprobado por:

Docentes Directores :

MSc. Delmy del Carmen Rico Peña

Inga. Sara Elisabeth Orellana Claros

Docente Director Externo :

Dr. Adán Hernández

AGRADECIMIENTOS

A PROCAFE, por todo el apoyo brindado para la realización de la parte experimental.

A Dr. Adán Hernández, por las sugerencias y el apoyo para la realización de los experimentos.

A Inga. Delmy Rico, e Inga. Sara Orellana por la orientación y aportes en la realización del presente trabajo de graduación.

Al personal de PROCAFE, en especial a Licda. Reina Funes de Cruz, Licda. Ana Delmy Figueroa de Melgar, Inga. Amanda de Pérez, Sra. Concepción de Jesús Lemus, Don Salvador y Sr. Ricardo Cornejo del Laboratorio de servicios analíticos. A Licda. Marta Lidia de Amaya y Don Orlando del Laboratorio de Cultivo de Tejidos; por su amistad, colaboración, apoyo y comprensión a lo largo de la realización de la parte experimental.

A Ing. Mauricio Montenegro, por su amable colaboración al proporcionar el freezer y refrigerador necesario para la conservación de las muestras de aguas mieles y su disposición para ayudar.

Al beneficio Cooperativa Cuzcachapa de R.L., por su valiosa contribución en la toma de muestras de aguas mieles procedentes de desmucilagador mecánico.

A mis profesores de la Escuela de Ingeniería Química por todos los conocimientos proporcionados en cada una de las asignaturas que cursé, las cuales formaron el criterio de ingeniería necesario para resolver problemas.

DEDICATORIA

A DIOS todopoderoso, por darme la oportunidad de realizar uno de mis sueños, escuchar mis oraciones, darme fuerza para seguir adelante en todas las pruebas de mi vida y sobre todo por esa sabiduría especial que ha derramado en mi ser.

A mi Madre, por su amor incondicional, por creer en mí siempre, por sus consejos tan valiosos en mi vida y por tantas cosas más.

A mi Padre, por enseñarme no con palabras sino con ejemplos porque en el silencio se cuanto me ama y yo a él.

A mis Hermanos por estar allí cuando los he necesitado y al mismo tiempo por la independencia que ayudaron a crear en mí, una de mis cualidades favoritas.

A Willy, por tu amor, paciencia, ayuda y por creer en mí a pesar de todo.... los triunfos no sabrían igual sin ti para compartirlos y las tristezas serían insoportables sin ti para consolarme.

A Víctor M. Quintanilla (Manolito), por tu amistad sincera, por estar allí sin importar el cansancio siempre que te he necesitado, por ser de las mejores personas que he conocido en toda mi vida (y he conocido muchas por cierto).

A Silvia Orantes, Elsy Escobar, Humberto Mejía, Karina Mónico, por su linda amistad a lo largo de todos estos años.

A la memoria de PUNTITO, por su compañía y por ser tan especial.

“No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.”

Johann Wolfgang Goethe (1749-1832) poeta y dramaturgo alemán.

RESUMEN

En el beneficiado húmedo del café, el agua es un recurso cuya cantidad es variable según el tipo de proceso, en él se genera altos volúmenes de desechos, en particular las aguas mieles que son contaminantes para los cuerpos de agua y su biodiversidad. El mucílago, forma parte éstas, que son el principal factor de contaminación, estas podrían procesarse para producir pectina.

A nivel mundial algunos residuos agroindustriales, ricos en sustancias pécticas, se emplean en la producción de pectina. Aunque las pectinas se encuentran en la mayoría de tejidos vegetales, el número de fuentes que pueden usarse para la fabricación comercial es muy limitado, porque la habilidad de éstas para formar geles depende del tamaño molecular y el grado de esterificación; pectinas de distintas fuentes no tienen la misma capacidad de gelificación por las variaciones en éstos parámetros. Su estructura es muy difícil de determinar puesto que pueden cambiar en el aislamiento a partir de las plantas, almacenamiento y procesamiento del material vegetal, además de las impurezas que la pueden acompañar.

Las pectinas o sustancias pécticas son heteropolisacáridos complejos que se componen principalmente de ácidos poligalacturónicos. En la actualidad, se extraen industrialmente por métodos fisicoquímicos. Los procedimientos de fabricación se basan en una hidrólisis, separación y recuperación

En la presente investigación se realizó el aislamiento de pectinas mediante el método de hidrólisis ácida utilizando ácido clorhídrico para la extracción de pectina en aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico de la variedad Bourbon y de estricta altura, obtenidas en un beneficio de café ubicado en el departamento de Santa Ana. Se evaluaron tres tratamientos de conservación de éstas aguas mieles libres de sólidos gruesos, de los cuales el más adecuado fué el congelamiento.

Se utilizó un diseño de Box-Behnken para estudiar el efecto de la temperatura, pH y tiempo de extracción sobre el rendimiento de pectina, considerando tres niveles de intensidad, alto medio y bajo. Se analizaron los resultados de este diseño mediante la creación de tablas y gráficas que muestran el modelo estadístico ajustado que permite generar predicciones y determinar valores óptimos de los factores experimentales.

El mayor rendimiento de pectina obtenido de la serie de corridas experimentales fué bajo las condiciones de temperatura = 70°C, pH = 3.5 y tiempo = 40 minutos con un valor de 2.2 g/l de agua miel libre de sólidos gruesos. La optimización del rendimiento se obtuvo bajo las condiciones: temperatura = 70°C, pH = 3.5 y tiempo = 46 minutos. El análisis fisicoquímico de la pectina extraída por el método empleado revela que es de bajo metoxilo (6.03%), alto contenido en ácido poligalacturónico (95.36%), soluble en agua, humedad del 9.9% y con pH= 4.02.

Los parámetros de calidad de la pectina obtenida se encuentran dentro de los requerimientos establecidos por la FAO. Según los rangos de la USP cumple, excepto para el mínimo de grupos metoxilos, sin embargo, el valor obtenido (6.03%) está dentro del rango especificado para pectinas comerciales.

INDICE GENERAL

1.0	EL BENEFICIADO DE CAFE	1
1.1	Generalidades del cultivo de café en El Salvador	1
1.1.1	Variedades, altitudes y área de producción de café	2
1.2	Producción de Café	4
1.2.1	Beneficiado tradicional	6
1.2.2	Beneficiado modular	6
1.2.3	Beneficiado artesanal	7
1.2.4	Exportaciones de café	7
1.3	Desechos generados en el beneficiado	8
1.3.1	Descripción del fruto de café	8
1.3.2	Residuos del beneficiado de café y su disposición	9
2.0	LAS PECTINAS	16
2.1	Localización, composición y estructura de la pectina	16
2.1.1	Clasificación	20
2.2	Propiedades físicas y químicas	22
2.3	Grado de esterificación	24
2.4	Enlaces de calcio	26
2.5	Viscosidad y peso molecular	27
2.6	Gelificación de la pectina	29
2.6.1	El estado gel	29
2.6.2	Mecanismo de gelificación de la pectina	30
2.7	Enzimas pécticas	32
2.7.1	Descripción de las enzimas pécticas	32
2.7.2	Clasificación de las enzimas pécticas	32
2.8	Métodos de extracción de pectina	34
2.8.1	Antecedentes de extracción de pectina de tejidos vegetales	35
2.8.2	Obtención industrial de pectina	36
2.9	Aplicaciones y usos de la pectina	40
2.9.1	En industria alimenticia	40

2.9.2	En industria farmacéutica.	40
2.9.3	Otras aplicaciones.	41
2.10	Demanda de pectina en El Salvador.....	41
3.0	ESTUDIO EXPERIMENTAL PARA EXTRACCION DE PECTINA DE AGUAS MIELES DEL BENEFICIADO DE CAFE.....	43
3.1	Variables del proceso para la extracción de pectina.....	43
3.2	Diseño experimental	46
3.2.1	Toma de muestras	47
3.2.2	Conservación de la muestra.	52
3.2.3	Diseño de experimentos y obtención de datos experimentales.	58
3.3	Extracción de pectina de aguas mieles del desmucilaginado mecánico.....	60
3.3.1	Procedimiento experimental para la extracción de pectina a partir de aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico	60
3.4	Análisis físicoquímico para pectina extraída.....	65
3.4.1	Métodos de identificación.	66
3.4.2	Número de metoxilo.....	66
3.4.3	Porcentaje de ácido galacturónico	66
3.4.4	Acidez.....	67
3.4.5	Humedad.....	67
3.4.6	Solubilidad	68
4.0	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	69
4.1	Influencia del pH, temperatura y tiempo de extracción en el rendimiento de pectina.	69
4.2	Caracterización de la pectina.....	82
4.3	Determinación de la calidad de la pectina extraída.....	83
4.4	Efectos ambientales en el proceso de extracción de pectina	85
5.0	CONCLUSIONES.....	87
6.0	RECOMENDACIONES	89
7.0	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	90
	ANEXOS.....	99

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1	Principales variedades de cafetos cultivadas en El Salvador	3
Cuadro 1.2	Altitudes y áreas de producción de café en El Salvador	4
Cuadro 1.3	Composición porcentual del fruto del cafeto	9
Cuadro 1.4	Valores promedio de algunas características determinadas en seis tipos de aguas residuales en 33 beneficios de café en El Salvador, 1996 -1999	11
Cuadro 1.5	Composición química de la pulpa de café	12
Cuadro 1.6	Composición química del mucílago de café	13
Cuadro 1.7	Composición química de la cascarilla de café	14
Cuadro 2.1	Clasificación de las sustancias pécticas de acuerdo a diferentes criterios	21
Cuadro 2.2	Tipos de pectina como se encuentran comercialmente	26
Cuadro 2.3	Clasificación de enzimas pécticas de acuerdo con los lineamientos de la Comisión de enzimas	33
Cuadro 2.4	Características típicas de pectinas comerciales	39
Cuadro 2.5	Importaciones de pectina en El Salvador años 2000 – 2006	41
Cuadro 2.6	Importaciones de pectina en El Salvador por país de origen años 2000 – 2006 en kilogramos	42
Cuadro 3.1	Características del agua miel proveniente de desmucilaginado mecánico.	50
Cuadro 3.2	Resultados obtenidos en las pruebas preliminares	50
Cuadro 3.3	Características del agua miel fresca proveniente de desmucilaginado mecánico	54
Cuadro 3.4	Características del agua miel almacenada	54
Cuadro 3.5	Resultados obtenidos en muestra fresca	54
Cuadro 3.6	Resultados obtenidos en pruebas de conservación después de 2 semanas	55
Cuadro 3.7	Diseño de Box-Behnken de tres variables	59
Cuadro 3.8	Los factores y niveles para el diseño experimental	62
Cuadro 3.9	Diseño de Box-Behnken para evaluación del rendimiento de pectina	63
Cuadro 3.10	Diseño de Box-Behnken con niveles reales y codificados	64
Cuadro 3.11	Características del agua miel proveniente de desmucilaginado mecánico	64
Cuadro 3.12	Resultados obtenidos para las pruebas en aguas mieles provenientes de desmucilaginado mecánico.	65
Cuadro 3.13	Pruebas de identificación de la pectina obtenida	66
Cuadro 3.14	Volúmenes obtenidos en la valoración de pectina obtenida	66
Cuadro 3.15	Porcentaje de grupos metoxilo y ácido galacturónico de pectina obtenida	67
Cuadro 3.16	pH de soluciones de pectina obtenida experimentalmente	67
Cuadro 3.17	Pesos obtenidos en pruebas de humedad	67
Cuadro 4.1	Nomenclatura utilizada en el análisis estadístico.	69
Cuadro 4.2	Análisis de varianza para rendimiento de pectina para un nivel de significancia de 10%	70
Cuadro 4.3	Análisis de Varianza de efectos más importantes en rendimiento de pectina para un nivel de significancia de 10%	72
Cuadro 4.4	Coefficientes de regresión para rendimiento de pectina	75
Cuadro 4.5	Niveles de factores para maximizar el rendimiento de pectina	81
Cuadro 4.6	Niveles de factores óptimos para el rendimiento de pectina	81
Cuadro 4.7	Resultados estimados para rendimiento de pectina	82
Cuadro 4.8	Resultados de los análisis para pectina obtenida	83
Cuadro 4.9	Comparación de resultados de pruebas de calidad para pectina con especificaciones FAO y USP.	83

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribución porcentual de las principales variedades de cafetos cultivadas en El Salvador.	3
Figura 1.2	Participación regional en la recepción de café en beneficios, cosecha 2004/2005	5
Figura 1.3	Producción y productividad del área cultivada de café, años cosecha 1991/1992 – 2004/2005	5
Figura 1.4	Exportaciones de café según país de destino, año cafetalero 2004/2005	8
Figura 1.5	Estructura del fruto del café	9
Figura 2.1	Cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado	17
Figura 2.2	Estructura esquemática de la pectina, incluyendo homogalacturonano “región lisa” y ramnogalacturonano “región de cabellera”	18
Figura 2.3	Estructura básica de la molécula de pectina	19
Figura 2.4	Representación esquemática del modelo “caja de huevos” para pectina de baja metilación.....	27
Figura 2.5	Formación de un gel de pectina HM	30
Figura 2.6	Ridgelmímetro (para el método USA-SAG)	31
Figura 3.1	Serie de desmucilaginosos mecánicos tipo DELVA	47
Figura 3.2	Agua miel procedente de desmucilaginado mecánico	47
Figura 3.3	Coágulo de pectina obtenida experimentalmente	50
Figura 3.4	Almacenamiento de agua miel.....	55
Figura 3.5	Agua miel calentada a 82°C y refrigerada a 8°C después de 20 días de almacenamiento	56
Figura 3.6	Coágulos de pectina obtenidos para las muestras almacenadas según los tres tratamientos: A) Autoclave, B) calentamiento a 82°C, C) congelada.....	57
Figura 3.7	Diseño de Box-Behnken, con puntos centrales	59
Figura 4.1	Gráfico de Pareto estandarizado para el rendimiento de pectina con un nivel de significancia de 10%.	71
Figura 4.2	Gráfico de Pareto estandarizado para los efectos más importantes en el rendimiento de pectina, con un nivel de significancia de 10%.	73
Figura 4.3	Gráfico de probabilidad normal para rendimiento de pectina.....	74
Figura 4.4	Gráfico de residuos versus predicciones para rendimiento de pectina.....	75
Figura 4.5	Gráfico de efectos principales para el rendimiento de pectina.....	76
Figura 4.6	Gráfico de interacciones entre los efectos para el rendimiento de pectina	77
Figura 4.7	Gráfico de superficie de respuesta para tiempo=40minutos.	77
Figura 4.8	Gráfico de contornos para superficie de respuesta estimada con tiempo=40 minutos.	78
Figura 4.9	Gráfico de superficie de respuesta para pH=3.0	78
Figura 4.10	Gráfico de contornos para superficie de respuesta estimada con pH= 3.0	79
Figura 4.11	Gráfico de superficie de respuesta estimada para temperatura=60°C	79
Figura 4.12	Gráfico de contornos para superficie de respuesta estimada con temperatura =60°C	80

INTRODUCCION

La producción cafetalera es un componente de la economía de El Salvador, sin embargo, el procesamiento industrial o beneficiado genera alteraciones ambientales negativas principalmente por la descarga de aguas residuales y materiales sólidos hacia cuerpos acuáticos. La importancia de estudios tendientes al aprovechamiento de los residuos del beneficiado de café radica en generar alternativas de ingreso, provenientes de recursos que pese a su potencial económico son material de desecho causantes de problemas ambientales. Uno de los residuos con prometedor potencial es el mucílago que forma parte de las aguas mieles, como fuente para la obtención de pectinas.

El mucílago desde el punto de vista físico es un sistema coloidal líquido, liofílico, siendo por tanto un hidrogel. Químicamente, el mucílago contiene agua, pectinas, azúcares y ácidos orgánicos. Durante la maduración del grano de café, el pectato de calcio, localizado en la laminilla media y la protopectina de la pared celular son convertidos en pectinas.

Las pectinas evolucionan en el tiempo según evolucionan los tejidos vegetales, desde las llamadas protopectinas o pectinógenos, productos altamente metilados, hasta los ácidos pécticos, sustancias amorfas prácticamente desprovistas de grupos metilo. El principal elemento estructural de las pectinas es el galacturonano, un polímero lineal de ácido galacturónico unido en $\alpha(1\rightarrow4)$ parcialmente metil esterificado. Las pectinas con más del 50% de grupos metil ester se clasifican como de alto metoxilo y aquellas con menos del 50% como de bajo metoxilo. Las pectinas obtenidas de distintas fuentes revelan diferencias significativas en sus estructuras y propiedades tecnológicas.

Asimismo son importantes por sus múltiples usos en la industria de alimentos, farmacéutica, etc. como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes. Los procesos de extracción de pectinas tradicionales consisten de las siguientes etapas: extracción ácida, filtración, concentración, precipitación, secado y pulverizado.

1.0 EL BENEFICIADO DE CAFE

La producción nacional de café ha tenido alzas y bajas en los últimos años, comportamiento que tiene su origen en la baja rentabilidad que el cultivo ofrece al productor, debido a varios factores como son los cambios en el precio en el mercado y los altos costos de producción.

En el procesamiento del café por la vía húmeda, uno de los principales problemas lo constituye el excesivo uso de agua para el proceso y la generación de aguas residuales con altos niveles de contaminación. Se ha prestado poca atención a los residuos, pero debido a la contaminación ambiental y a la escasez de materia prima para procesar y elaborar raciones para animales, estos materiales han recibido gran atención comparativamente con el pasado.

1.1 Generalidades del cultivo de café en El Salvador

La industria cafetalera representa para El Salvador una de sus principales y más importantes actividades agroindustriales desde finales del siglo XVIII y principios del siglo XIX, cuando fue introducido al país. La etapa de recolección y beneficiado comienza en octubre en las áreas bajas y puede llegar hasta marzo en las áreas de mayor altitud.

En 1994, El Salvador era el onceavo país de mayor producción de café en el mundo, con una producción casi ocho veces menor que el mayor productor, Brasil. Esto implica que el impacto que pudiese tener El Salvador en el mercado mundial del café es pequeño en comparación a dicho país (Porres y Franco, 2000).

En la última década, el comportamiento de los precios de los mercados internacionales no ha sido particularmente favorable para el agronegocio regional del café, lo que ha provocado que los productores, en particular los vinculados a las micro, pequeñas y

medianas empresas del sector, inicien un proceso de especialización y adición de valor al producto final para mejorar sus opciones de mercado y atender una demanda creciente de café dentro de los mercados verdes y socialmente justos. Este proceso de especialización de los pequeños y medianos productores de café permite a la vez, invertir en prácticas que son más amigables con la biodiversidad.

Si bien es cierto, a finales de 2004 los precios mejoraron notablemente, estos incrementos no han sido suficientes para sacar al subsector de la crisis en que se encuentra, las ligeras alzas sólo han sido de carácter especulativo, lo que hace que la crisis cafetalera regional se mantenga.

1.1.1 Variedades, altitudes y área de producción de café

La planta, el cafeto, es un arbusto de hojas verdes con flores blancas ligeramente perfumadas que se transforman en un fruto (una drupa) de color rojo no mayor de 2 cm y que contiene dos semillas.

En el ámbito mundial las especies de café más importantes por su orden son: ***Coffea arábica***, ***Coffea canephora***, y ***Coffea Liberico***; actualmente se explotan en el mundo, dos especies: ***Coffea arábica*** y ***Coffea canephora***. Sin embargo, la única especie que se cultiva en El Salvador es la *Coffea arábica* representada por las élites de las variedades Bourbon, Pacas y la Typica llamada también Arábico. Las variedades más comúnmente cultivadas son Bourbon y Pacas. La siembra de la variedad Bourbon se realiza arriba de los 1,000 msnm donde se explota su mayor capacidad de producción. La variedad Pacas se considera una mutación originada en el Bourbon y ha demostrado tener mejor adaptación al bajío (500 – 800) msnm (Flores, 1979).

La distribución porcentual de las principales variedades de cafetos cultivadas en El Salvador se muestra en la figura 1.1 y el área cultivada de estas se detalla en cuadro 1.1.

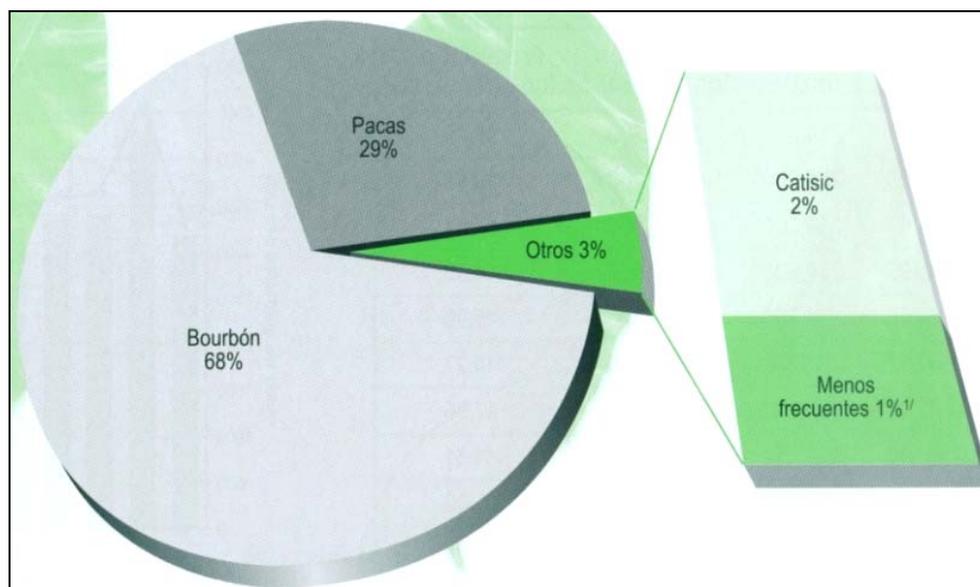


Figura 1.1 Distribución porcentual de las principales variedades de cafetos cultivadas en El Salvador.

1/ variedades menos frecuentes: Tekisic, Catuai, Pacamara, Catimor, Caturras, etc

Fuente: PROCAFE (2005)

Cuadro 1.1 Principales variedades de cafetos cultivadas en El Salvador

Variedades cultivadas	Área cultivada (Mz)
Bourbón	156,344
Pacas	66,286
Otras variedades	7,291
Total	229,921

Fuente: PROCAFE (2005)

En el año 2005 se estimó que el parque cafetalero de El Salvador tenía 229,921 manzanas lo que equivale a 160,944.7 hectáreas (1,609,447,000 m²). De acuerdo con la zona de producción y factores como el clima y la altura, el café posee características a partir de las cuales se clasifica la calidad del grano. Las altitudes y áreas de producción se detallan en el cuadro 1.2 y la distribución geográfica puede observarse en anexo 1.

Cuadro 1.2 Altitudes y áreas de producción de café en El Salvador

Altitudes	Área de producción por región (Mz)			total (Mz)
	Occidental	Central	Oriental	
Strictly High Grown. Estricta altura (mayor 1200 msnm)	22,62	9,55	3,416	35,586
High Grown o Media altura (de 800 a 1200 msnm)	31,807	29,184	12,149	73,14
Central Standard o Bajío (menor de 800 msnm)	65,405	27,398	28,392	121,195
Total	119,832	66,132	43,957	229,921

Fuente: PROCAFE – Consejo Salvadoreño del Café (2005)

1.2 Producción de Café

Tomando como base la producción real obtenida durante los años 1991/1992 – 2004/2005, se observa una tendencia hacia la baja de producción, como se ilustra en la figura 1.3. Según estudios realizados por PROCAFE (Fundación Salvadoreña para las Investigaciones del Café), la diferencia entre el volumen de quintales oro uva obtenido en 2001/2002 (2.38 millones) y el volumen registrado en 2006/2007 (1.7 millones) muestra que la cosecha ha caído cerca del 27%. La productividad por manzana bajó de 11 a 8 qq oro uva/mz, la cual se estimó considerando una superficie de 220,000 mz, ajustada con base a la reducción en la superficie reportada en las regiones durante el periodo analizado (PROCAFE, 2007).

El pronóstico preliminar de cosecha 2007/2008 realizado por PROCAFE, en 183 fincas del parque cafetalero nacional, entre el 25 de junio y 16 de julio de 2007, que representan el 6.1% de la superficie nacional, indican que la cosecha esperada 2007/2008, con relación a la cosecha real 2006/2007, experimentará un incremento en la producción nacional equivalente al 13.5%. Es de destacar que la fluctuación positiva en la cosecha 2007/2008 está siendo influenciada por el incremento en la producción en más de 68% de fincas, lo cual indica los efectos de la recuperación productiva en el parque cafetalero.

La recepción de café en beneficio se concentra en la región occidental del país, donde Santa Ana es el departamento con mayor participación en la recepción, seguido por Ahuachapán y Sonsonate. En figura 1.2 se presenta la participación regional en la recepción de café en beneficios para la cosecha 2004/2005 y en anexo 2 se muestra la recepción semanal de café para la cosechas 2006/2007-2007/2008 según reportes presentados al Consejo Salvadoreño del Café.

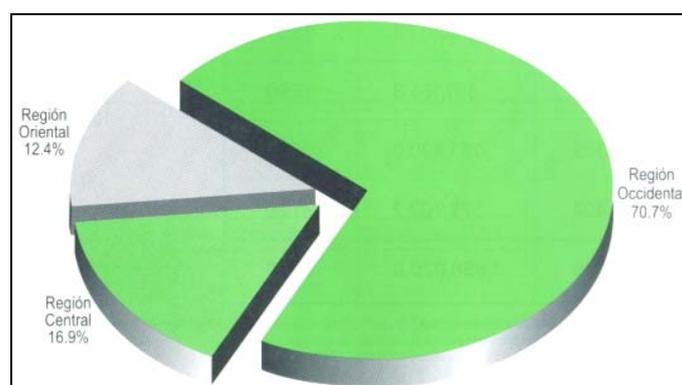


Figura 1.2 Participación regional en la recepción de café en beneficios, cosecha 2004/2005

Fuente: Consejo Salvadoreño del Café (2005)

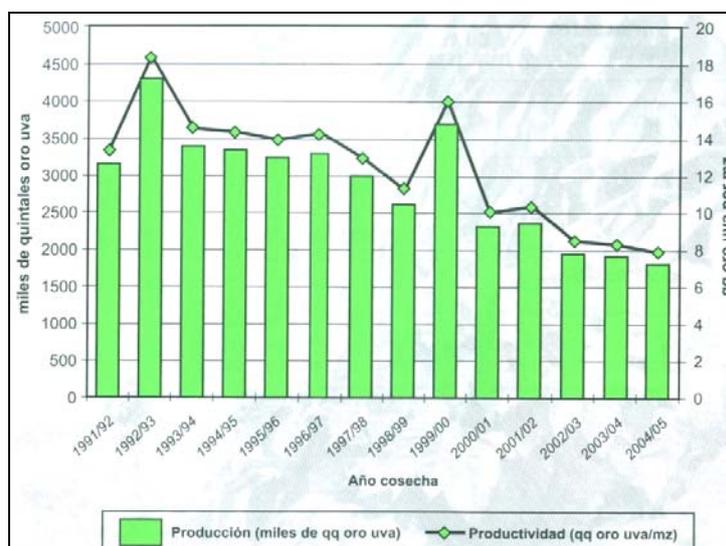


Figura 1.3 Producción y productividad del área cultivada de café, años cosecha 1991/1992 – 2004/2005

Fuente: Consejo Salvadoreño del Café (2005)

1.2.1 Beneficiado tradicional (PROCAFE, 2007)

Este sistema históricamente se ha utilizado en El Salvador. Debido a su diseño, requieren grandes volúmenes de agua para las operaciones de transporte efectuado durante el proceso del café, que son despulpado, clasificación y lavado; este tipo de beneficiado se caracteriza por:

- Alto consumo de agua, el cual aproximadamente es 120 galones por qq oro.
- La capacidad de procesamiento instalada oscila de 5,000 a 200,000 qq oro.
- Todo el proceso es mecanizado y algunos de ellos con tecnología moderna.
- Requiere de inversiones altas para su montaje y mantenimiento.

1.2.2 Beneficiado modular

Este tipo de beneficio surge en El Salvador, como una solución a las exigencias que la comercialización mundial de café ha provocado sobre la industria. Esto se puede resumir en tres aspectos básicos: darle valor agregado al café mediante la diferenciación de la calidad, acercarse al consumidor en la cadena de valor y disminuir la generación de desechos líquidos.

El beneficiado modular o compacto presenta facilidad para el procesamiento del café en la fase húmeda hasta llegar a obtener un pergamino lavado de excelente calidad.

En El Salvador, este tipo de beneficiado se viene utilizando desde 1998 y hasta la fecha existen en el ámbito nacional, siendo esto un indicador de los cambios en la industrialización del café. La maquinaria que se utiliza tiene las siguientes particularidades:

- Requiere de poco espacio, por lo que facilita su montaje y operatividad, pudiendo ser accionado por motores estacionarios o electricidad.
- Consume menos agua (30 galones/qq oro) debido a que se despulpa sin agua y el desmucilaginado es mecánico, por ser un proceso continuo, el lavado y

desmucilaginado son simultáneos, ahorrando tiempo para la obtención del pergamino.

- Debido a los volúmenes procesados el secado es realizado en patio.
- Quienes lo utilizan generan mayor valor agregado al producto y tienen oportunidad de diferenciarlo por su origen.
- Facilidad en el manejo y aprovechamiento de los desechos.
- Permite la participación de mano de obra familiar.

1.2.3 Beneficiado artesanal

Se practica en fincas de pequeños caficultores que manejan bajos volúmenes de producción, adicionándole mayor valor agregado a la producción de café pergamino.

Las características de este tipo de beneficiado son las siguientes:

- Requiere de un pulpero, la construcción de una pila de lavado y un patio.
- La mayoría son operados manualmente con uso de mano de obra familiar.
- La fase de lavado y fermentado se realiza en la misma pila.
- Facilita el aprovechamiento de la pulpa en la misma finca.
- Normalmente se instalan en la cercanía de la vivienda, lo cual facilita su manejo como el secado y almacenado del mismo.

1.2.4 Exportaciones de café

El Consejo Salvadoreño del Café (CSC), estima que un total de 1,711,691 qq de café oro fueron exportados a países destinos para la cosecha 2004/2005. De ésta, la mayoría se exportó 33% hacia Estados Unidos, 25% Alemania, 12% Bélgica, 8% Francia, 7% Japón y el resto 15% a los países de Canadá, Inglaterra, Italia, Holanda, España, entre otros. En la figura 1.4 se presenta la distribución porcentual según país de destino.

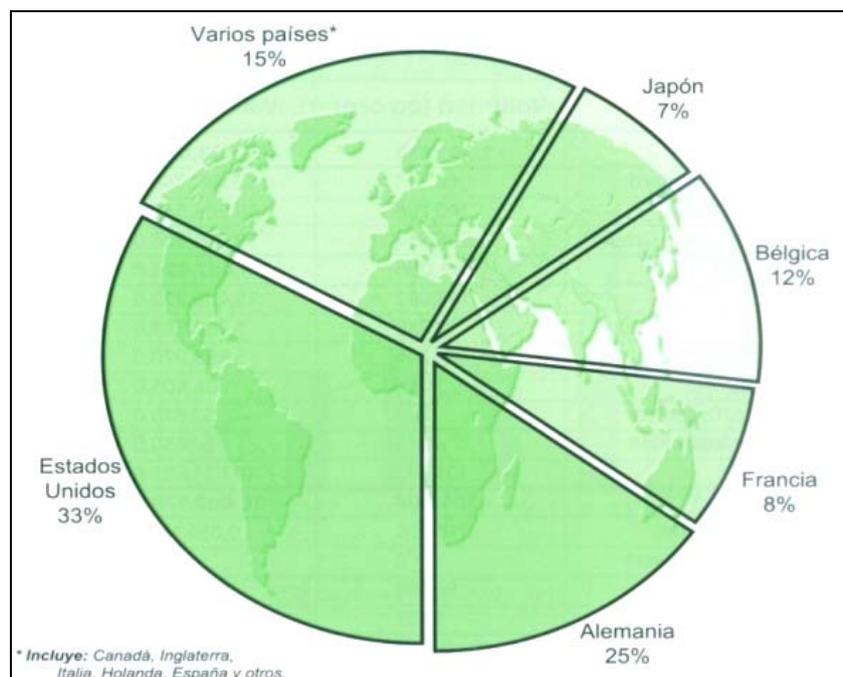


Figura 1.4 Exportaciones de café según país de destino, año cafetalero 2004/2005

Fuente: Consejo Salvadoreño del Café (2005)

1.3 Desechos generados en el beneficiado

El beneficiado de café produce residuos sólidos (pulpa y cascarilla), residuos líquidos (aguas mieles) y emisiones atmosféricas generadas por los hornos utilizados para el proceso de secado de café y en la descomposición de los residuos orgánicos anteriormente mencionados. Todas estas emisiones causan impactos al medio ambiente, por lo que todos los beneficios de café deben someterse a la Ley del Medio Ambiente y cumplir con las reglas y normas que regulan dichas emisiones. En el anexo 4 se presenta la normativa ambiental vigente para este tipo de descargas.

1.3.1 Descripción del fruto de café

El fruto del café es un pequeño grano ovalado con un periodo de crecimiento que va de mayo a septiembre y una etapa de maduración que se inicia en octubre y finaliza en diciembre. La estructura del fruto del café se muestra en la figura 1.5



Figura 1.5 Estructura del fruto del café

Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos43/pulpa-de-cafe/pulpa-de-cafe.shtml>

El volumen de residuos generados en el proceso de beneficiado de café está definido por el fruto de café uva, el cual posee la composición porcentual en peso detallada en el cuadro 1.3.

Cuadro 1.3 Composición porcentual del fruto del cafeto

Componente	Peso fresco %	Humedad %	Peso seco %
Grano cereza (total)	100	65.5	34.5
Pulpa	43.2	77	9.94
Mucílago	11.8	88.5	1.35
Cascarilla	6.1	32	4.15
Café verde	38.9	51	19.06
Café oro	21.66	12	

Fuente: Serrano (1983)

1.3.2 Residuos del beneficiado de café y su disposición

En Centroamérica, el café se procesa por el método húmedo. En éste sistema el fruto de café recién cortado se recibe en el beneficio e inmediatamente se procede a removerle la pulpa por medios mecánicos para luego eliminar el mucílago por fermentación natural o con máquinas desmucilagadoras. Una vez que el mucílago se degradó con la fermentación, el grano de café es lavado y deshidratado al sol o en secadoras mecánicas. Cuando los granos están secos, se les remueve el pergamino y

se someten a un proceso de selección obteniéndose el producto final de exportación llamado café-oro. En anexo 3 se presenta en forma general este proceso.

El beneficiado de café genera tanto residuos sólidos como líquidos, con un alto uso del agua para el despulpado, transporte, fermentación, lavado y clasificación del grano de café. En El Salvador el promedio de agua requerida para procesar 1 qq/oro es de 120 galones para el beneficiado tradicional. En una producción promedio de 2.5 millones de qq/oro, se generan 1.14 millones de m³ de aguas residuales. Estos desechos, actualmente son manejados depositándolos en lagunas de sedimentación, lo que permite aprovechar los sólidos sedimentados como abono orgánico (PROCAFE, 2005).

La tendencia actual va encaminada hacia el menor consumo de agua posible. La mayoría de los beneficios, sobre todo los antiguos, están cerca de ríos debido a que anteriormente era necesario utilizar mucha agua para la producción, ahora con la implementación de nuevas tecnologías y pulperos especiales, el consumo de agua puede disminuir considerablemente, utilizando de 0.25 a 0.30 litros de agua por kilo de café, por lo que reciben el nombre de beneficios ecológicos.

De acuerdo con mediciones de consumo de agua realizadas en diferentes beneficios de El Salvador, se puede afirmar que existen fuertes variaciones entre centros de procesamiento. Larde et al. (1997) realizaron mediciones en 33 beneficios de diferente capacidad, situados en las zonas occidental, central y oriental de El Salvador; encontraron que el consumo promedio de agua era de 10.4 l/kg de café-oro y el rango de variación era de 3.2 a 41.8 l/kg de café-oro. En la etapa de despulpado, el consumo promedio era de 4.4 l/kg de café-oro y el rango de variación era de 0.0 a 23.8 l/kg de café-oro y en la etapa de lavado el consumo promedio fue de 6.1 l/kg de café-oro y el rango de variación era de 0.6 a 17.8 l/kg de café-oro.

En cuanto a la composición química de las descargas, las aguas de despulpado presentaron una demanda química de oxígeno (DQO) promedio de 21,900 mg/l (rango de variación entre 2,400 mg/l a 91,600 mg/l) y un pH alrededor de 4.5. Las aguas de

lavado presentaron una DQO de 17,000 mg/l (rango de variación entre 3,000 mg/l y 59,500 mg/l) y un pH promedio de 4.4, esta información se presenta en el cuadro 1.4

Cuadro 1.4 Valores promedio de algunas características determinadas en seis tipos de aguas residuales en 33 beneficios de café en El Salvador, 1996 -1999

Aguas residuales	DQO (mg/l)	Sólidos totales (mg/l)	Sólidos volátiles (mg/l)	Turbiedad (UNT)	pH
De despulpado	40,400	22,000	18,500	3600	4.3
De lavado	20,600	12,300	10,600	2100	4.4
De café lavado	2,800	2,100	1,800	650	5.2
De pulpa	54,000	27,100	21,800	6400	4.5
De mucilago	46,800	34,800	29,500	4600	4.3
Jugo de pulpa	67,400	49,600	37,600	1200	4.6
NSO13.49.01:06 *	2,500	1,040	-	-	-

*Norma salvadoreña obligatoria.

Fuente: PROCAFE (2003)

La utilización de los residuos del café está determinada por una serie de factores tales como: las cantidades producidas, su distribución temporal y regional, el contenido de humedad, el almacenamiento y la preservación, la importancia comercial de los productos obtenidos y la capacidad de competencia con otros materiales.

a) PULPA DE CAFÉ

En los desechos sólidos, la pulpa representa el 40% del peso total del fruto y su humedad es de aproximadamente 85%, es uno de los residuos mayoritarios durante el beneficiado, esto implica que en una producción nacional promedio de 2.5 millones de qq/oro, se generan 5 millones de qq de pulpa equivalente a 250 mil toneladas cortas (PROCAFE, 2005). Su composición química varía dependiendo de muchos factores, y se presenta en cuadro 1.5

Cuadro 1.5 Composición química de la pulpa de café

Componente	Contenido (%) base seca
Cafeína	0.95
Polifenoles	2.9
Azúcares totales	4.1
Proteína cruda	13.3
Lignina	19.3
Materia grasa bruta	1.73
Celulosa	18.3
Digestibilidad materia orgánica	55.0
Cenizas	9.70

Fuente: Porres y Franco (2000)

A pesar de que se han planteado múltiples alternativas para su aprovechamiento, estas no se han implementado de una manera integral, principalmente porque la relación costo-beneficio es poco atractiva para los beneficiadores, y en algunos casos no resuelve completamente el problema debido a los grandes volúmenes producidos.

Algunas de las alternativas que han sido propuestas en la literatura (Rodríguez, 2008) para la utilización de la pulpa de café son:

- Complemento dietético para nutrición animal.
- Materia prima para la obtención de compuestos orgánicos presentes en la pulpa.
- Abono orgánico y mejoramiento de la estructura del suelo.
- Materia prima para la producción de compuestos orgánicos con procesos microbiológicos.
- Materia prima para la producción de hongos comestibles (basidiomicetos).
- Crecimiento de larvas y lombrices.
- Prensado y combustión de la pulpa.

La selección de una de estas alternativas depende de varios factores, tales como: la capacidad del beneficio, el tipo de tecnología empleada para el proceso y otra, que

puede ser la más importante, la falta de interés por parte de los productores, para mejorar de una manera integral, todo lo relacionado con la producción y comercialización del café.

b) MUCÍLAGO DEL CAFÉ

Está constituido por el mesocarpio del fruto y tiene un espesor desde 0.4 mm en la cara plana del grano hasta 2.0 mm en la parte convexa. Representa de un 15% - 20% del peso de la fruta fresca. El pH del mucílago fresco varía entre 5.5 - 6.2. Posee un contenido de pectina (en base seca) que puede variar entre 15.9% - 33%. El resto de componentes lo constituyen: agua, azúcares reductores y no reductores, celulosa, cenizas, etc. (Porres y Franco, 2000). La composición química se detalla en cuadro 1.6.

Cuadro 1.6 Composición química del mucílago de café

Componente	% p/p
Sustancias pécticas totales	35.0
Azúcares reductores	30.0
Azúcares no reductores	20.0
Celulosa + cenizas	14.2

Fuente: Serrano (1983)

En los cafés suaves el mucílago se retira antes del secado. En la mayoría de los países productores de esta calidad de café, el mucílago se elimina por medio de la fermentación natural y el lavado posterior. El desmucilaginado mecánico permite obviar los problemas antes mencionados, dependiendo de la tecnología utilizada para la eliminación y el manejo del mucílago.

Durante el proceso de fermentación de los granos de café despulpado, el mucílago es degradado a ácido galacturónico, ácidos orgánicos (principalmente acético y láctico), alcohol y otros productos de la fermentación y el pH del mucílago baja hasta aproximadamente 4.0. En este punto los granos de café son lavados con agua dando como resultado las aguas mieles, teniendo éstas una demanda química de oxígeno de

aproximadamente 17,000 mg/l y se producen en un volumen de aproximadamente 3.8 a 6.1 litros por kg de café-oro producido (Lardé, et al. 1997).

El mucílago del fruto de café es muy rico en sustancias pécticas, de las que se podría obtener pectinas, de igual forma por su contenido de azúcares se puede utilizar para la producción de miel y de alcohol etílico y por fermentación anaerobia se puede producir gas metano (Calle, 1977).

c) CASCARILLA O PERGAMINO DE CAFÉ

Constituye un 20% en peso del grano de café (base seca), su contenido de humedad es de 9-12%. La composición química se muestra en el cuadro 1.7. Su poder calorífico es 17,500 kJ/kg, por sus características físicas y químicas constituye un buen combustible para ser utilizado en hornos de máquinas para secado de café (Menchú, 1973).

Cuadro 1.7 Composición química de la cascarilla de café

Componente	% p/p (base seca)
Carbono	47.2
Hidrogeno	4.6
Azufre	0.12
Oxígeno	41.8

Fuente: Menchú (1973)

d) AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales del beneficiado son el producto del proceso de despulpado y lavado del café principalmente, dependiendo del tipo de beneficiado. Estos son descargados inadecuadamente en algunos de los casos; contaminando el suelo, mantos freáticos o fuentes naturales, debido a la carga orgánica, pH ácido, sólidos disueltos, sólidos sedimentables, entre otros. Cabe mencionar que algunos beneficios cuentan actualmente con un sistema de tratamientos de desechos sólidos, lo cual disminuye significativamente el impacto negativo al medio ambiente.

En la industria cafetalera se presentan varias opciones para el manejo de las aguas residuales, unas de éstas son más eficientes que otras en la descontaminación, y están asociadas generalmente con el costo para su instalación y manejo. Las lagunas de tratamiento son el medio más generalizado por su fácil implementación. Las lagunas consisten en excavar en el suelo una superficie determinada, que tengan la capacidad para retener el agua durante una semana de trabajo del beneficio, en sitios expuestos al viento y al sol para provocar la evaporación, reteniendo en el fondo todos los sólidos disueltos que pueden ultimarse como sustrato en la lombricultura (IHCAFE, 2007).

De acuerdo con Vásquez, (1996) entre las limitaciones en el manejo de residuos de café se encuentran:

- i. La mayoría de los residuos agrícolas y dentro de ellos los de café, presentan contenidos de humedad muy altos. Esto torna más costoso su transporte y su elaboración (si fuera para uso combustible).
- ii. Muchos de los residuos son altamente perecederos, por lo que los mismos deben ser tratados oportunamente y en forma apropiada, para atenuar la presencia de plagas y aparición de malos olores
- iii. La generación de los mismos en una corta época del año desincentiva la aparición de empresas que se aboquen como función primaria al tratamiento y aprovechamiento de ellos.
- iv. El empleo de los mismos como compost produce desechos voluminosos y bajos en nutrientes, respecto de algunos fertilizantes inorgánicos.
- v. El lugar de aparición del desecho debe estar muy cerca del sitio de producción, de otra forma el transporte haría prohibitivo el empleo de los desechos orgánicos

2.0 LAS PECTINAS

El término “pectina” es algo engañoso porque llamarlo así supone una molécula, de hecho, pectina describe una familia de oligosacáridos y polisacáridos que tienen características comunes, pero son extremadamente diversas en sus estructuras finas (Ridley, O’Neill y Mohnen, 2001).

2.1 Localización, composición y estructura de la pectina

La pared celular primaria está compuesta principalmente de polisacáridos, enzimas y proteínas estructurales. Los polisacáridos pueden dividirse en tres diferentes grupos, llamados celulosa, hemicelulosas y pectinas.

La pectina, existe dentro de las células primarias de las plantas superiores terrestres como un importante elemento estructural, están implicadas en la textura y maduración de los frutos. Su contenido es más alto en la laminilla media donde forma una capa de apoyo entre las formaciones celulares en frutas y vegetales, actúa como una sustancia de enlace, soportando y estabilizando funciones y controles debido a su gran capacidad de hincharse y a su naturaleza coloidal en el sistema de balance de agua de la planta.

Las sustancias pécticas se encuentran asociadas con la celulosa y hemicelulosa. La asociación, entre pectina y hemicelulosa, se menciona como covalente, aunque no todas las fracciones pécticas se mantienen esta manera, puesto que ciertas cantidades pueden removerse de la pared celular con agua fría, indicando que no están ligadas covalentemente (Thakur, Singh y Handa, 1997).

La pectina es una de las más complejas biomacromoléculas en la naturaleza, probablemente la más complicada, porque está compuesta de tantos como 17 diferentes monosacáridos, además de todas las combinaciones posibles con esos monosacáridos, la madre naturaleza proporciona un número distinto de polisacáridos,

que juntos forman la pectina (Vincken, et al., 2003). Las características estructurales de éstos se resumen en el anexo 5.

El componente más abundante de las pectinas es el ácido galacturónico, que forma el esqueleto principal de la molécula consistente en una cadena de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ para formar ácido poligalacturónico como se ve en la figura 2.1. Estos residuos pueden estar parcialmente metilados, esterificados en el C-6 con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina. También contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones (Heredia et al, 1995).

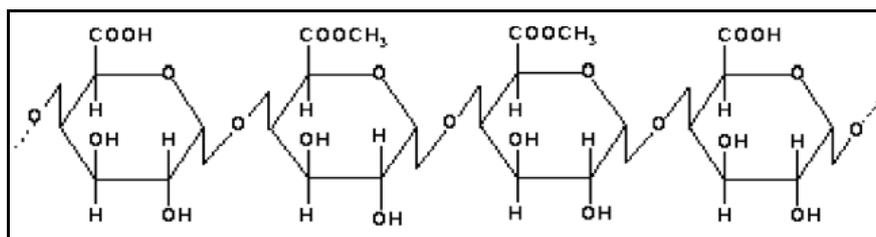


Figura 2.1 Cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado

Fuente: Willats, 2006

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones definidas (De Vries et al., 1983; Pérez et al., 2000). La “región lisa” (*smooth region, SR*) u homogalacturonano (HG) consiste en un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, los cuales pueden estar acetilados en el C-2 o en el C-3, o metilados en el C-6. La “región de cabellera” (*hairy region, HR*) o ramnogalacturonano I (RG I) es un heteropolímero en el que los residuos de ácido D-galacturónico del esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$, a los cuales pueden unirse largas cadenas de arabinano y galactano mediante el C-4 (De Vries y Visser, 2001). En la figura 2.2 puede visualizarse dicha estructura.

El Ramnogalacturonano I consiste en un esqueleto compuesto de hasta 100 repeticiones del disacárido [(1→2)- α -L-ramnosil-(1→4)- α -D-ácido galactosilurónico] o [\rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1→4)- α -D-GalapA-(1→)]. Los residuos de ramnosa pueden estar sustituidos en O-4 con azúcares neutros. La proporción de la ramificación de residuos de ramnosa varía de 20% al 80% dependiendo de la fuente del polisacárido (Vincken et al., 2003).

Otros elementos estructurales de la pectina son xilogalacturonanos (XGA) y el confuso ramnogalacturonano II (RG II). El Ramnogalacturonano II lleva residuos de azúcares peculiares como Api (D-apiosa), AceA (3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilosa), Dha (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-lixo-heptulosarico) y Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-manano-octulosónico) (O'Neill et al., 2004; Vincken, et al., 2003). Se ha reportado que las proporciones relativas de esos diferentes elementos estructurales pueden variar significativamente en los diferentes tejidos vegetales (Voragen et al., 1995).

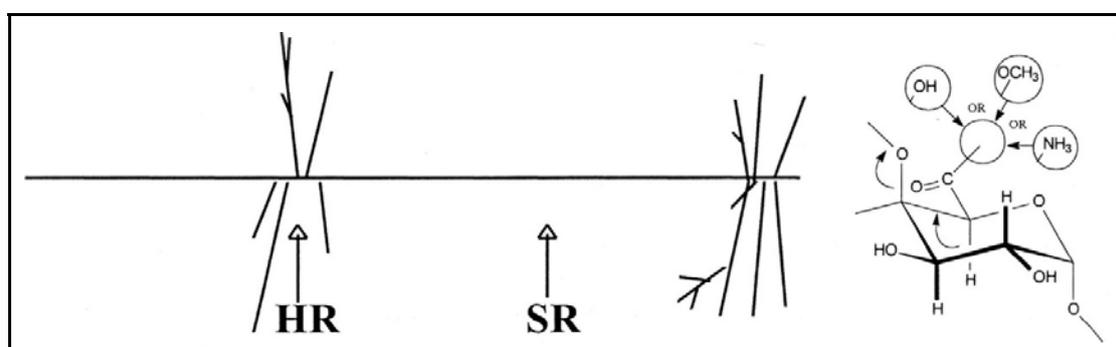
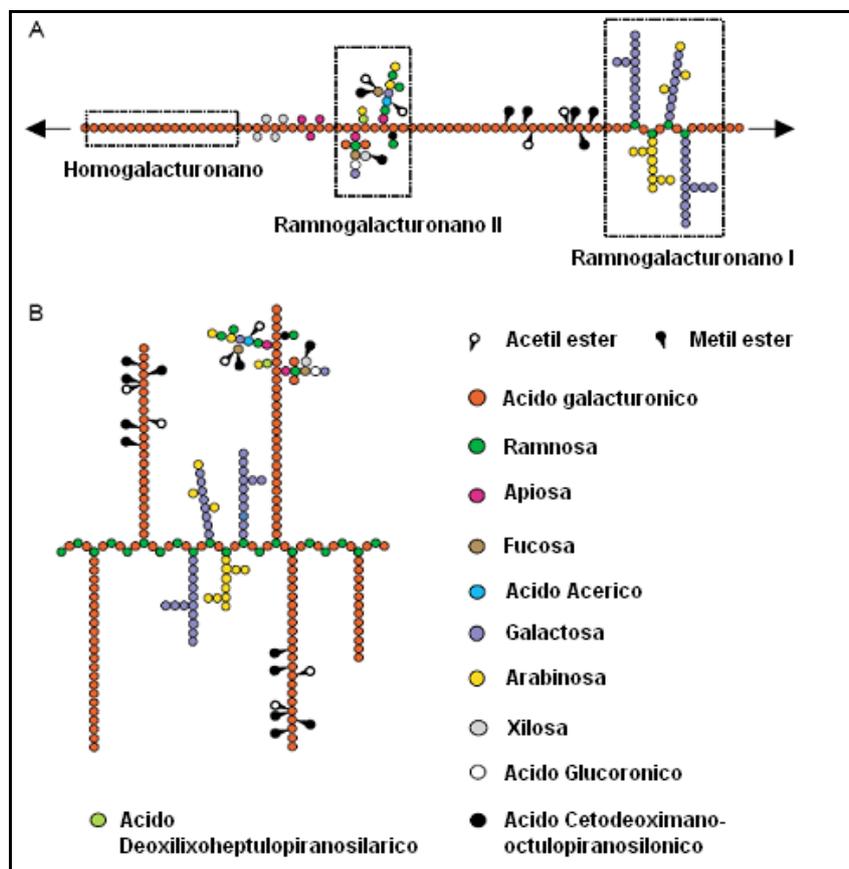


Figura 2.2 Estructura esquemática de la pectina, incluyendo homogalacturonano “región lisa” y ramnogalacturonano “región de cabellera”

Fuente: De Vries y Visser, 2001

La estructura exacta del Ramnogalacturonano II no ha sido aún elucidada y su estructura se actualiza continuamente, tiene un esqueleto de HG más que de RG, con cadenas laterales complejas atadas a residuos de ácido galacturónico. Recientemente se ha aceptado que el ramnogalacturonano y el homogalacturonano constituyen el esqueleto dominante de los polímeros pécticos como se muestra en la figura 2.3A. Sin embargo, una estructura alternativa ha sido propuesta recientemente en donde HG es

una cadena lateral de RGI, figura 2.3B (Vincken et al., 2003). Una cosa que no se discute es que las pectinas son un extremadamente complejo y estructuralmente diverso grupo de polímeros. Las estructuras finas pueden ser extremadamente heterogéneas entre plantas, entre tejidos, y aún en una sola célula. Las longitudes de las cadenas pueden variar considerablemente y la composición de los azúcares de RG I también puede ser altamente heterogénea. En contraste, se piensa que RG II tiene una estructura altamente conservada (Willats, Knox y Mikkelsen, 2006).



Representación esquemática convencional A) y alternativa recientemente propuesta B)

Figura 2.3 Estructura básica de la molécula de pectina

Fuente: Willats, Knox y Mikkelsen, (2006)

Es importante observar que los polímeros mostrados en la figura 2.3, son para ilustrar solamente algunos de las principales encontrados en la mayoría de pectinas más que las estructuras definitivas.

2.1.1 Clasificación

a) Según el tipo de modificación que sufre la cadena principal

Atendiendo al tipo de modificación que sufre la cadena principal o esqueleto de la molécula, el término genérico pectina puede aplicarse a: protopectinas, ácido péctico, ácido pectínico, y pectina (BeMiller, 1986). La protopectina es insoluble en agua, mientras las otras tres sustancias son totalmente o parcialmente solubles en agua (Serra et al., 1992).

La *protopectina* es una matriz de sustancia péctica que por hidrólisis da lugar a la pectina o al ácido pectínico. Protopectina es el término utilizado para describir las sustancias pécticas insolubles en agua encontradas en los tejidos vegetales y de las cuales se forman las sustancias pécticas solubles.

Los *ácidos pécticos* son galacturonanos que no contienen grupos metilos. También pueden denominarse ácido poligalacturónico. A las sales de los ácidos pécticos se les llama pectatos o poligalacturonatos.

Los *ácidos pectínicos* son galacturonanos con cantidades variables de grupos metilos esterificados con los grupos carboxilos del C-6. A las sales de los ácidos pectínicos, se les llama pectinatos. Estas sustancias tienen la propiedad de formar geles con azúcares, con ácidos y, si el contenido de metilos es bajo, con otros componentes como sales de calcio.

b) Según las características de solubilidad

Las características de solubilidad han permitido clasificar las sustancias pécticas en: *pectina soluble en agua*, la cual puede ser extraída del tejido vegetal con agua caliente o soluciones salinas diluídas; *pectina soluble en agentes quelantes*, que se extrae con soluciones de EDTA, CDTA, hexametáfosfato, imidazol, etc., y *protopectina* que se solubiliza por calor en presencia de ácido o álcali (Van Buren, 1991). Estas características de solubilidad de las sustancias pécticas fueron aceptadas originalmente por la American Chemical Society (1944) y aún son empleadas por algunos investigadores. Los procedimientos de extracción diferencial son convenientes pero no enteramente selectivos, por lo que es recomendable clasificar a los polisacáridos

pécticos de acuerdo con sus características estructurales conforme a los procedimientos de aislamiento (Aspinall, 1982). En la Tabla 2.1 se resumen los criterios de clasificación de pectinas.

Las *pectinas solubles en agua* están formadas básicamente por homogalacturonano. El ácido galacturónico está esterificado con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina.

Las *pectinas solubles en agentes quelantes* tienen una composición similar pero pueden presentar un 2% de ramnosa, principalmente sustituyendo al ácido galacturónico en la cadena principal, y del 10 al 20% de otros azúcares en forma de cadenas laterales.

Las *protopectinas* presentan una estructura de la molécula similar pero con un alto contenido de azúcares neutros, principalmente galactosa y arabinosa.

Cuadro 2.1 Clasificación de las sustancias pécticas de acuerdo a diferentes criterios.

Criterio de clasificación	Componente
Solubilidad	Pectina soluble en agua Pectina soluble en agentes quelantes Pectina soluble en álcali o ácidos
ACS ***	Acido péctico (pectato)* = ácido poligalacturonico** Acido pectínico (pectinato)* = pectinas** Protopectina
Estructura	Sobre la base de la cadena principal: Homogalacturonano, ramnogalactoronano I, ramnogalacturonano II, xilogalacturonano, apiogalacturonano
Comercial	Pectinas de alto metoxilo Pectinas de bajo metoxilo Pectinas de alto o bajo metoxilo amidadas Pectinas acetiladas

Fuente: Aspinall (1982). * en forma de sal **nombre común. ***ACS: American Chemical Society

2.2 Propiedades físicas y químicas

a) Propiedades físicas

La pectina es soluble en agua y en ella se dispersa para dar soluciones muy viscosas, esta solubilidad disminuye cuando aumenta su tamaño molecular. En solución las pectinas presentan grandes áreas superficiales que están relacionadas con su carga eléctrica negativa. Esta carga varía según la proporción de grupos carboxilo libres y aparentemente responsables de la rápida precipitación de las pectinas con electrolitos de diferentes potenciales eléctricos.

Las sales de cationes monovalentes de ácido péctico y pectínico son usualmente solubles en agua, sales de cationes di o trivalentes son débilmente solubles o insolubles. Las soluciones de pectina exhiben comportamiento no Newtoniano y pseudoplástico característico de la mayoría de polisacáridos. Como con la solubilidad, la viscosidad de una solución de pectina está relacionada al peso molecular, concentración de la preparación, al pH y la presencia de iones en solución, por ejemplo, la adición de iones monovalentes ocasiona una reducción en la viscosidad, el grado es mayor con el decrecimiento del grado de esterificación. La adición de sales de cationes di o trivalentes tiene el efecto opuesto (BeMiller, 1998).

En general, viscosidad, solubilidad, y gelificación están relacionadas, es decir, factores que incrementan la fuerza del gel, por ejemplo, incrementaran la tendencia de gelificar, disminuirá la solubilidad, e incrementara la viscosidad y viceversa. Estas propiedades físicas de las pectinas son función de su estructura que es la de un polianión lineal (BeMiller, 1998).

La solubilidad de la pectina es directamente proporcional al número de grupos carboxílicos esterificados e inversamente proporcional al peso molecular, además el pH de la solución, la temperatura, la concentración y la naturaleza de los solutos tienen un efecto marcado. Por ser muy soluble en forma de polvo que es como se comercializa, se liga al agua formando una capa que funciona como una barrera que obstaculiza a la

porción restante de pectina interactuar con el agua (Thakur et al, 1997; Wang, et al, 2002).

La importancia comercial de la pectina se debe predominantemente a su habilidad única de formar geles untables ante la presencia de un agente deshidratante (azúcar) a un pH cercano a 3 y/o en presencia de iones calcio (jaleas, mermeladas de fruta sólida).

El contenido de ácido anhidrogálico, grado de metilación, tamaño molecular, distribución de los grupos carboxilos, y por lo tanto la carga en la molécula son importantes para las propiedades funcionales de las soluciones de pectina y pueden afectar la estructura y propiedades texturizantes de los geles (Constenla y Lozano, 2003).

Resumiendo, las cualidades de la pectina que influyen en los caracteres del gel son: la longitud de la molécula pectínica, su grado de esterificación y la proporción entre los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Los factores del medio más importantes que influyen en la formación del gel son: La temperatura, pH, azúcar y otros solutos, y la presencia de iones calcio.

b) Propiedades químicas (BeMiller, 1998)

Las pectinas disueltas experimentan desesterificación y depolimerización en sistemas acuosos. El pH de mayor estabilidad es cercano a 4 a valores superior e inferior a 4, la desesterificación y depolimerización puede ocurrir concurrentemente, donde la velocidad de desesterificación es mayor que la depolimerización. La presencia de solutos, que bajan la actividad de agua, reduce la velocidad de estas reacciones.

La desesterificación ocurre normalmente por mecanismos catalizados ácidos y básicos de hidrólisis éster. La hidrólisis catalizada por ácidos ocurre preferentemente en los enlaces glucosídicos del L-ramnopiranosilo. La hidrólisis de estas uniones produce cadenas de galacturonoglicanos con grado de polimerización de aproximadamente 25. Las cadenas laterales, particularmente las que contiene unidades L-arabinofurosilo,

podrían preferentemente removerse por hidrólisis debido a la inherente estabilidad de la hidrólisis catalizada por ácido de los enlaces glucosídicos del glucoronosilo. Sin embargo, si las cadenas laterales están unidas a secuencias de ramnogalacturonano, no sería posible convertir las regiones de cabellera en regiones lisas por tratamiento ácido porque la labilidad de los enlaces L-ramnopiranosilo resultarían en la consecuente depolimerización de la cadena principal.

A valores de pH de 5-6 las soluciones de pectina son estables sólo a temperatura ambiente. Si la temperatura aumentara, las cadenas de pectina se rompen por reacción de β -eliminación, reacción que es estimulada por aniones orgánicos. La desesterificación de la pectina procede simultáneamente con la reacción de depolimerización por β -eliminación que ocurre solo en las unidades de monosacárido que están esterificadas. A pH arriba de 6, la desesterificación y depolimerización son reacciones rápidas aún a temperatura ambiente, y la velocidad de cada reacción aumenta con incrementos en el pH.

2.3 Grado de esterificación

Dependiendo del origen de la pectina y del modo de extracción los grupos carboxilos de los residuos de ácido galacturónico presentan un grado variable de esterificación por metanol y pueden estar parcialmente o completamente neutralizados por iones sodio, potasio o amonio. En ciertas pectinas, adicionalmente, los grupos hidroxilos están parcialmente acetilados.

Un factor importante que caracteriza las cadenas de pectina es el grado de metilación, GM (Degree of esterification, DE) que se define como el número de moles de metanol por 100 moles de ácido galacturónico. Según este criterio, las pectinas han sido clasificadas en dos grupos: las que presentan más de un 50% de metilación, pectinas altamente metiladas (High Methoxyl, HM); y las que contienen menos del 50% de metilación, pectinas de baja metilación (Low Methoxyl, LM).

La principal fuente de las pectinas de alta metilación es la piel de cítricos y la manzana. La pectina de baja metilación se obtiene comercialmente mediante demetilación química de la pectina de alta metilación o de fuentes como papa, pera, receptáculos de girasol (Pilgrim et al., 1991; Constenla y Lozano, 2003).

De acuerdo con Herbstreith & Fox las pectinas se dividen en tres grupos comerciales sobre la base de sus diferentes propiedades gelificantes:

a) Pectinas altamente metiladas (HM)

Tienen más del 50% de las unidades de ácido poligalacturónico esterificadas, prácticamente no reaccionan con los iones calcio. La fuerza del gel depende, entre otras cosas del contenido de ácido, tipo de pectina, concentración y de los sólidos solubles. La gelificación usualmente tiene lugar a pH abajo de 3.5 y contenido de sólidos mayores al 55%. El grado de esterificación está relacionado a la velocidad de formación de geles y a la textura del mismo en determinadas condiciones similares, significa que las pectinas altamente esterificadas gelifican más rápido, por ejemplo a mayores temperaturas que las que estén menos esterificadas. También formarán texturas más elásticas y suaves. Esta correlación exacta requiere de una distribución de grupos carboxilos muy homogénea inter e intra molecularmente.

b) Pectinas de baja metilación (LM)

Son las de DE menor al 50%, pueden formar geles con iones calcio, pero no forman geles con azúcar ni ácidos, y no dependen de altas concentraciones de sólidos solubles. Un buen balance entre pectina y concentración de iones calcio conducen a una textura óptima. Si se excede del óptimo, por un lado, se producirá un gel frágil con tendencia a sinéresis o formación de pectinato de calcio. Como la gelificación con pectinas LM se produce a bajo contenido de sólidos solubles y a pH alto, esto abre numerosas aplicaciones posibles en productos dietéticos y lácteos.

c) Pectinas amidadas (HMA y LMA)

Estas son pectinas que han sido desesterificadas con amoníaco en vez de ácidos.

Durante la desesterificación, parte de los grupos éster han sido reemplazados por grupos amida, que modifican las propiedades gelificantes en comparación a las desesterificadas con ácido. Las pectinas bajo metoxilo amidadas, al igual que las pectinas no amidadas, requieren iones calcio para gelificar, sin embargo, fijarán bien con menores cantidades presentes, además, la temperatura de punto de gel de las pectinas amidadas es mucho menos influenciada por la dosis de calcio.

En el cuadro 2.2 se resume los tipos de pectina que pueden encontrarse comercialmente.

Cuadro 2.2 Tipos de pectina como se encuentran comercialmente

Tipo	Grado de Metilación	Grado de Amidación	Descripción Común
Altamente metiladas	74-77	0	gelificación ultra rápida
Altamente metiladas	71-74	0	gelificación rápida
Altamente metiladas	66-69	0	gelificación rápida media
Altamente metiladas	58-65	0	gelificación lenta
Baja metilación	40	0	gelificación lenta
Baja metilación	30	0	gelificación rápido
Amidada	35	15	gelificación lenta
Amidada	30	20	gelificación rápida

Fuente: www.cybercolloids.net

2.4 Enlaces de calcio.

La capacidad del calcio para formar complejos insolubles con pectinas se debe a la unión de dicho ión con los grupos carboxilos libres de cadenas distintas del polímero, formando como consecuencia una red tridimensional (BeMiller, 1986). Los enlaces de calcio implican otros grupos funcionales aparte de los grupos carboxilo. En este sentido, la interacción fuerte entre el calcio con los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo de la pectina han sido descritos por Rees et al., (1982).

Para la coagulación y gelificación de la pectina inducida por calcio ha sido propuesta una estructura llamada “caja de huevos”, en la que los iones calcio interaccionan iónicamente por coordinación con oxígenos de dos cadenas adyacentes, originando un

cruzamiento de cadenas (Rees et al, 1982) como se describe en la figura 2.4. Los enlaces cruzados de calcio son más estables en presencia de otros enlaces cruzados vecinos cooperativos. La máxima estabilidad se alcanza cuando están presentes de 7 a 14 enlaces cruzados consecutivos. El calcio no coagula las pectinas con grado de esterificación mayor del 60% y las concentraciones necesarias para coagular pectinas con bajo grado de metilación aumenta a medida que el peso molecular disminuye (Van Buren, 1991).

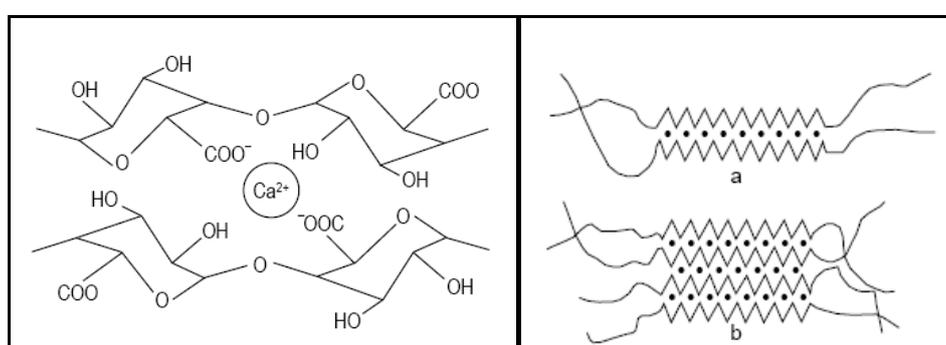


Figura 2.4 Representación esquemática del modelo “caja de huevos” para pectina de baja metilación

Fuente: www.journal.su.ac.th/index.php/suij/article/view/48

2.5 Viscosidad y peso molecular.

La viscosidad de las soluciones de pectina de alto metoxilo es muy dependiente de las variables: grado de esterificación, longitud de la molécula, concentración de electrolitos, pH y temperatura. Concentraciones diferentes de un azúcar y diferentes azúcares afectan a la viscosidad de manera distinta. La viscosidad se incrementa marcadamente a medida que la temperatura se acerca a la temperatura de ebullición.

El peso molecular de la pectina, relacionado con la longitud de la cadena, es una característica muy importante de la que dependen la viscosidad de sus disoluciones y su comportamiento en la gelificación de las jaleas. La determinación cuidadosa del peso molecular es difícil, debido a la extrema heterogeneidad de las muestras y a la tendencia de las pectinas a agregarse, aún bajo condiciones no favorables a la

gelación. Diferentes técnicas experimentales dan diferentes pesos moleculares promedio. La técnica de difusión de la luz de Rayleigh da el valor del peso promedio. Una descripción completa de pesos moleculares necesita información sobre la distribución estadística de tamaños moleculares.

Los pesos moleculares de pectinas y su distribución fueron estudiados sistemáticamente por Owens en 1948 por viscosimetría y determinaron que los pesos moleculares variaban de 20,000 a 300,000.

Los viscosímetros operan con principios básicos. Los diseños capilar y rotacional han sido los más frecuentemente aplicados a la pectina. En la viscosimetría capilar, el flujo se inicia a través de una columna de vidrio vertical capilar a presión y temperatura constante. Los datos son tratados para obtener la viscosidad intrínseca $[\eta]$ que se expresa como volumen/peso.

La viscosidad intrínseca $[\eta]$, se relaciona con el peso molecular a través de la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K M_w^a$$

Donde M_w es el peso molecular promedio (Axelos y Thibault, 1991). En forma logarítmica, al representar $\ln [\eta]$ frente a $\ln M_w$ se obtiene una recta, cuya ordenada en el origen es $\ln K$ y la pendiente es el parámetro a . La ecuación es válida a alrededor de 105 g/mol (Anger y Berth, 1986). El exponente es variable entre 0.5 para polímeros enrollados y 1.7 para moléculas extendidas y rígidas. Los diferentes disolventes, polímeros y temperaturas afectan al exponente a (Daniels et al., 1970).

Aparte de los métodos citados de determinación del peso molecular de pectina por difusión de luz y el viscosimétrico, se usa también el método de cromatografía de filtración molecular en columna (Fishman et al., 1989) y el de cromatografía líquida de alta resolución. Otra técnica muy utilizada en industria alimenticia es la cromatografía de exclusión de tamaños de alta resolución (HPSEC) usando pectinas para calibrar el

sistema. Este método es rápido pero la separación depende de la forma de la pectina (volumen hidrodinámico) más que del peso molecular. La medida de pesos moleculares exactos sólo es posible cuando las moléculas analizadas tienen la misma forma molecular y densidad que los estándares usados, donde la fuerza hidrodinámica depende del grado de metilesterificación de la pectina y/o el grado de ramificación de los azúcares neutros. Por lo que no siempre sería un método exacto (Kravtchenko, Voragen y Pilnik, 1992).

2.6 Gelificación de la pectina.

2.6.1 El estado gel

El estado "gel" se puede considerar como intermedio entre el estado líquido, puesto que ciertos geles pueden tener hasta 99.9% de agua, y el estado sólido, puesto que su organización permite mantener su forma y resistir a ciertos constreñimientos. Por tanto, el gel es un sistema difásico constituido por una red macromolecular tridimensional sólida que retiene entre sus mallas una fase líquida.

Antes de la gelificación, las moléculas del polímero forman una verdadera solución; la formación del gel implica, por consiguiente, la asociación de cadenas entre sí o de segmentos de cadenas entre ellas. Se pueden distinguir diversas etapas de transición:

- El estado "solución", o el polímero en forma de solución; las macromoléculas no están organizadas unas respecto a las otras;
- el estado "gel", que aparece cuando las cadenas están suficientemente asociadas para formar una red o gel, desde luego, elástico;
- en cuanto y a medida que las cadenas se organizan entre sí, el gel se transforma cada vez más rígido, lo que da lugar, en general al fenómeno de la sinéresis; el gel se contrae y exuda una parte de la fase líquida.

El estado "gel" representa entonces, un compromiso entre las asociaciones polímero-polímero y entre asociaciones polímero-solvente. Lo que significa que el gelificante debe tener ciertas propiedades físico-químicas comunes a las macromoléculas

insolubles (interacciones entre polímeros preponderantes) y a las macromoléculas hidrosolubles (capacidad de solvatación). Estas propiedades dependen de sus estructuras.

2.6.2 Mecanismo de gelificación de la pectina

El mecanismo de gelificación y las propiedades de los geles dependen entre otros factores de la temperatura, del pH y del grado de metilación.

Un gel de pectina se forma cuando porciones de HG se enlazan para formar una red cristalina tridimensional en la que el agua y los solutos están atrapados, muchos factores determinan las propiedades gelificantes incluyendo temperatura, tipo de pectina, grado de esterificación, grado de acetilación, pH, azúcar y otros solutos, y el calcio. En pectinas HM las zonas de unión se forman por el entrecruzamiento de HG mediante puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas entre grupos metoxilo, ambos promovidos por la alta concentración de azúcar y pH bajo, en la figura 2.5 se esquematiza la formación de un gel de pectina HM. En pectinas LM las zonas de unión están formadas por entrecruzamiento de los iones calcio con los grupos carboxilo libres (mecanismo “caja de huevos”). Es cada vez más evidente que el patrón de la metilesterificación es tan crítico en la determinación de las propiedades reológicas (Willats, Knox y Mikkelsen, 2006).

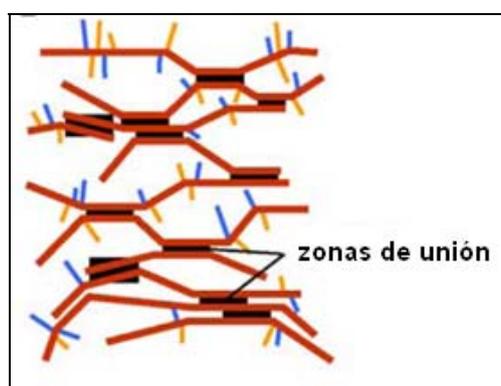


Figura 2.5 Formación de un gel de pectina HM

Fuente: Willats, Knox y Mikkelsen, 2006

Set rápido y set lento son designaciones de la pectina referidas a la relación en que una estructura incipiente de jalea desarrolla una estructura a la temperatura de gelificación. Su ritmo de gelificación influencia la textura del producto. El ritmo de gelificación disminuye cuando disminuye el grado de esterificación. Ritmos intermedios conducen a designaciones tales como set rápido-medio, set lento medio, etc. Los geles de pectina de HM son más rápidos en alcanzarse que los de LM. Los geles de pectinas HM con alto grado de esterificación se alcanzan más rápidamente que los de pectinas HM con menor grado de esterificación bajo el mismo gradiente de enfriamiento.

Las jaleas patrón están normalmente elaboradas con pectina HM y de set lento. El ritmo lento de gelificación permite tiempo suficiente (25-30 min) para que las burbujas de aire atrapadas puedan escapar. Las pectinas de set rápido permiten jaleas de productos en la gama de pH entre 3.30 a 3.50. Las de set lento las permiten entre 2.80 y 3.20. Una mezcla de pectina de HM y LM impartirá cierto grado de tixotropía a una jalea.

Una jalea se considera normal en los patrones U.S. si tiene un grado ridgelimétrico de 23.5% o 150° SAG. Un ridgelímetro es un instrumento como el que se muestra en la figura 2.6, en el que todas las pectinas HM están estandarizadas en los Estados Unidos.



Figura 2.6 Ridgelímetro (para el método USA-SAG)

Fuente: Herbstreith&Fox

2.7 Enzimas pécticas.

2.7.1 Descripción de las enzimas pécticas.

Las enzimas pectolíticas o pécticas, llamadas comúnmente pectinasas, constituyen un complejo sistema de enzimas que incluye hidrolasas, liasas y oxidasas, que intervienen en la degradación o modificación de la pectina. Se encuentran en la mayoría de las plantas superiores y son producidas también por hongos filamentosos, bacterias algunas levaduras, e insectos. Las pectinasas son en su mayor parte extracelulares, pero otras se localizan intracelularmente y son las responsables del metabolismo de los productos de degradación generados por la acción de las pectinasas extracelulares. Mucho se ha avanzado en el conocimiento de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la pectina. Estas incluyen las transferasas, que cumplen la función de unir las unidades monoméricas, incorporar los sustituyentes y generar la estructura final (Mohnen, 1999).

2.7.2 Clasificación de las enzimas pécticas (Rombouts y Pilnik, 1980; Fogarty y Kelly, 1983; Vlugt-Bergmans et al., 2000)

Las enzimas que actúan sobre el HG y el RG pueden ser divididas en enzimas depolimerizantes y desesterificantes. Las enzimas depolimerizantes se clasifican de acuerdo con los siguientes criterios:

- 1) tipo de ruptura de los enlaces glicosídicos: hidrolítico o transeliminativo
- 2) mecanismo de la reacción: tipo exo o endo, y
- 3) preferencia de actividad respecto del grado de esterificación metílica del sustrato (alto o bajo).

Las enzimas desesterificantes se clasifican de acuerdo al tipo de grupo éster que hidrolizan, ya sea metil-, acetil- o feruil-éster. En el cuadro 2.3 se presenta la clasificación de las pectinasas.

Cuadro 2.3 Clasificación de enzimas pécticas de acuerdo con los lineamientos de la Comisión de enzimas

	Enzima (nombre común)	Código de la comisión de enzimas	Principales productos de la reacción o modo de acción
Hidrolasas			
Esterasas	Pectin-metilesterasa (PME)	EC 3.1.1.11	HG bajo metoxilo + metanol
	Pectin-acetilesterasa	EC 3.1.1.6	HG desacetilado + ácido acético
	Ramnogalacturonano-acetilesterasa		RG I desacetilado + ácido acético
	Ferulil-esterasa *		RG + ácido ferúlico
Glucosidasas	Endo-poligalacturonasa (PG)	EC 3.2.1.15	Oligogalacturonatos +AGA
	Exo-poligalacturonasa (PG)	EC 3.2.1.67	AGA + digalacturonato
	Ramnogalacturonano-hidrolasa		Hidrólisis AGA +Ram en RGI
	Ramnogalacturonano-ramnohidrolasa		Libera AGA Terminal unido a Ram en RGI (hidrólisis exo)
	Xilogalacturonanorano-hidrolasa		Libera Xil del XG
	Endo-galactanasa *		Hidrólisis de galactanos
	α - galactosidasa	EC 3.2.1.22	Remoción de residuos Gal
	β - galactosidasa *	EC 3.2.1.23	Remoción de residuos Gal
endoarabinasa *		Hidrólisis de arabanos	
α - L- arabinofuranosidasa		Remoción de residuos Ara	
Liasas			
	Pectin-liasa	EC 4.2.2.10	Oligogalacturonatos insaturados metilados
	Pectato-liasa	EC 4.2.2.2	Oligogalacturonatos insaturados
	Ramnogalacturonano-liasa		Traneliminación Ram-AGA en RG I
Oxidasas			
	Galacturónico-oxidasa		Oxidación del AGA

*Enzimas accesorias. Fuente: Grassin, C. y Fauquembergue, P. (1996)

Las enzimas que atacan el esqueleto principal de los polímeros pécticos son Poligalacturonasas (PGasas), Polimetilgalacturonasa, Pectin- y pectato-liasas.

Las que actúan sobre el RG es la ramnogalacturonasa (RGasa), el nombre actual es α -D-galactopiranosilurónico-(1,2)- α -L-ramnopiranosil hidrolasa que se abrevia RG-hidrolasa.

Entre las enzimas que degradan las cadenas laterales de los polímeros pécticos y remueven sustituyentes de la cadena principal (enzimas accesorias) están: α -L-arabinofuranosidasas y arabinoxilano arabinofuranohidrolasa; Endo-arabinasas, α - y β -galactosidasas; Endo- y exo-galactanasas; Feruloil- y p-coumaril-esterasas; Acetil- y metil-esterasas; también existen otras enzimas con acción sobre la pectina que incluyen la galacturónico oxidasa o ácido urónico oxidasa.

2.8 Métodos de extracción de pectina (Garna et al., 2007)

La estructura y composición de las pectinas depende de la fuente vegetal, los métodos de preparación, el método de extracción, el método usado para separar las pectinas extraídas de otros materiales solubles, el tipo y duración de la purificación antes del análisis y de los procedimientos analíticos usados en los ensayos y caracterización.

La extracción de pectinas tiene que ser rápida para evitar su degradación en las materias primas por enzimas producidas por microorganismos (PME, PG, PL, etc.) o por la pectinmetilesterasa PME natural en las plantas. La degradación de pectinas durante el almacenamiento del material vegetal por las enzimas puede llevar a pectinas con un comportamiento gelificante completamente diferente. Para evitar esto, las materias primas sólidas deben secarse inmediatamente después de la producción.

El proceso de extracción es la operación más importante para obtener pectina de fuentes vegetales. La pectina puede ser extraída del material de la pared celular por agua fría y/o caliente o soluciones buffer, soluciones frías y/o calientes de agentes quelantes, ácidos diluidos en caliente, y por hidróxido de sodio diluido en frío.

La extracción con agentes quelantes presenta la desventaja de ser difícil la remoción de los quelantes residuales. La extracción alcalina podría disminuir el grado de metilación,

acetilación, y la longitud de la cadena principal de ácido galacturónico por β -eliminación. La mayor cantidad de pectina generalmente se obtiene por extracción en ácido caliente. Es también el acercamiento más conveniente para extracción industrial.

La extracción de pectina es, por tanto un proceso fisicoquímico complejo en el cual la solubilización, extracción y depolimerización de macromoléculas ocurren al mismo tiempo, siendo extraídas con mayor facilidad las pectinas de alto grado de esterificación (Kertesz, 1951).

Varios investigadores han seleccionado las condiciones para la extracción que rinden la mayor cantidad de pectina con las características deseadas. Esto es especialmente cierto en los datos divulgados, parcialmente en publicaciones científicas, y principalmente en literatura patentada de la extracción comercial de pectinas.

Luego de la extracción, la pectina puede purificarse por varias técnicas como: precipitación con alcohol, diálisis, precipitación con metales, cromatografía de intercambio de iones.

A escala industrial, la precipitación alcohólica es ampliamente utilizada para purificar pectinas porque es conveniente para la producción a gran escala. Las muestras de pectina pueden enriquecerse en el contenido urónico removiendo otros compuestos (azúcares libres, sales, etc.) lavando el precipitado con diferentes concentraciones de alcohol para obtener pectina de alta pureza.

2.8.1 Antecedentes de extracción de pectina de tejidos vegetales.

Para cáscaras de cítricos o residuos de manzana se extraen pectinas de alta metilación en ácido mineral diluido caliente a pH de 1-3, temperatura 50-90°C durante 3-12 horas (Rolin, et al., 1998). En los métodos ordinarios, se extrae de cáscara de cítricos en agua caliente (aproximadamente 85°C) a pH ácido (1-3) por más de 30 minutos. Manabe et al., (1988) reportan el uso de energía de microonda en un recipiente abierto para

extraerla de pulpa de mandarina, casi 5% más pectina se extrae en 15 minutos de la que podría extraerse en 60 minutos por métodos convencionales de calentamiento a 85°. Kratchanova et al., 1994 reportan que un pretratamiento con microondas de materiales machacados aumentan el rendimiento de pectina y resulta un producto que mayor grado de esterificación y fuerza de gel comparado a los métodos convencionales.

También se ha estudiado el efecto de tratamiento con ultrasonido Panchev, N. Kirchev, C. y Kratchanova (1988) la cual aumenta el rendimiento sin afectar las propiedades de la pectina extraída

Otra fuente de pectinas estudiada es la pulpa de remolacha (Michel et al 1985; Phatak et al 1988; Rombouts y Thibault, 1986; Renard y Thibault, 1993; Levigne et al 2002), tiene desventaja respecto a la de manzana y cítricos como la de tener un grado de metilación bajo y presencia de grupos acetilos que bloquean la gelificación, sin embargo esta pueden ser modificadas químicamente (May, 1990). Otra materia prima conteniendo pectina potencialmente adecuada en cantidad es la semilla de girasol. El tejido blanco que contiene la semilla es rico en pectina de alto peso molecular que es muy rica en ácido galacturónico. Está también acetilada y tiene un DE bajo y parece tener un bajo nivel de almidón (Lim et al., 1976).

Existen publicaciones sobre pectina de cascajo de soya (Kalapathy y Proctor 2001); residuos de melocotón (Pagan e Ibarz 1999; Pagan et al 2001); pectinas del aloe (Patente US 5929051), así como pectinas de maracuyá (D'Addosio, et al., 2005), cáscara de papaya (Manrique G. D. Lajolo F. M. 2002), nopal (Goycoolea, F.M. y Cárdenas, A. 2003) y mango que en países tropicales representan una disponibilidad grande de materia prima para extracción de pectinas.

2.8.2 Obtención industrial de pectina.

Para fines industriales, la fuente de obtención se restringe principalmente a los subproductos de la industria de jugos de frutas: a las cáscaras de frutos cítricos

conteniendo cerca del 25% de sustancias pécticas y del bagazo de manzana rindiendo alrededor del 15 -18% de pectina. Otras fuentes de pectina incluyen residuos de girasol, y residuos de remolacha de la obtención de azúcar aunque la pectina de esta última es de inferior como agente gelificante comparada a la pectina cítrica o de manzana.

Las etapas de la producción industrial de acuerdo a Rolin et all, (1998) son:

a) PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

La materia prima puede usarse directamente para la obtención de pectina, pero la mayor parte es secada para envío y almacenamiento, así se puede producir pectina fuera de la época de cosecha y/o en otra localidad. Se lava con agua para eliminar azúcares antes del secado para minimizar la caramelización.

b) EXTRACCION

La cáscara pretratada se extrae en agua que ha sido acidificada por ejemplo con ácido clorhídrico o nítrico. Condiciones típicas son pH 1-3, temperatura 50- 90° C, y duración 3-12 horas. Durante la extracción, tiene lugar la depolimerización de la pectina y posiblemente de otros biopolímeros conectados, y la pectina se disuelve. Un pH más bajo disocia uniones iónicas que retienen la pectina en el tejido vegetal. Además de hidrolizar enlaces glucosídico, las condiciones de extracción también hidrolizan enlaces esterés, más específicamente los metilester del C-6 y los acetatos donde la pectina puede estar esterificada por grupos hidróxidos. Los procesos de extracción causan entonces una reducción en el grado de polimerización así como del grado de metil esterés y acetyl esterés. Los rendimientos de pectina incrementan con la acidez, temperatura y la duración, pero el producto perderá demasiado, en grado de polimerización si todos esos parámetros están en el máximo. La combinación de bajo pH y baja temperatura ayuda a la hidrólisis de las uniones esterés mas la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, y es así, preferido para la producción de pectina con relativo bajo grado de esterificación.

c) FILTRACION

Luego de la extracción se filtra en una o más etapas para separar el extracto acuoso de pectina del residuo vegetal. Una filtración eficiente requiere de una razonable baja viscosidad, además, los sólidos no deben haber sido pulverizados por excesivo tratamiento químico (por ejemplo, vigorosa agitación). Materiales insolubles en agua, como celulosa de madera o tierra de diatomáceas pueden utilizarse para mejorar la porosidad de la torta filtrante, el material gastado típicamente se utiliza para alimentación de ganado.

Dependiendo del tipo de pectina, el extracto no puede contener más de (0.6 - 1.0)% de pectina, porque la viscosidad de otra manera se tornaría demasiado alta. Las consecuencias de este límite es que (100 - 170) kg de agua deben ser removidos por cada kilogramo de pectina corriente abajo del proceso. Esto, requiere energía, es posible economizar reutilizando el calor generado en las operaciones de enfriamiento o condensación, pero aun así la producción de pectina consume energía.

d) DEL EXTRACTO ACUOSO A PECTINA ALTO METOXILO EN POLVO

El extracto clarificado, puede opcionalmente pasarse a través de una columna con resina de intercambio de cationes y concentrada por evaporación. La pectina es precipitada mezclando el extracto con un alcohol apropiado (etanol, 2-propanol). Finalmente, el precipitado se lava con más alcohol, se seca y muele. El polvo esta entonces listo para estandarización (por ejemplo mezclado don otros lotes de pectina y/o sucrosa para asegurar la uniformidad. El alcohol se recupera por destilación.

Una alternativa a la precipitación con alcohol es la adición de apropiadas sales metálicas al extracto. La pectina forma sales insolubles con Cu^{2+} y Al^{3+} . La precipitación con Al^{3+} era anteriormente usada industrialmente. La remoción de los iones metálicos de la pectina precipitada se hace por lavados en una solución acuosa acidificada de alcohol.

e) PECTINA BAJO METOXILO Y PECTINA AMIDADA

La pectina derivada de materiales cítricos o manzanas se ha descrito normalmente con un grado de esterificación entre 55 y 75. Un menor grado de esterificación puede

alcanzarse acidificando del extracto y dejándolo por algún tiempo antes de la precipitación o por tratamiento de la pectina precipitada (sin secar) con ácido o álcali durante la suspensión en etanol acuoso.

El amoníaco puede convertir los grupos carboxílicos metilesterificados de una pectina a amidas primarias. Esto se hace industrialmente suspendiendo la pectina precipitada en una mezcla de alcohol y agua con amoníaco disuelto. La desesterificación tiene lugar concurrentemente. Escogiendo condiciones adecuadas respecto de la concentración de amoníaco, actividad de agua, y temperatura, pueden producirse pectinas con variadas proporciones de amidación, meti-esterificación, y grupos carboxílicos libres.

f) ESTANDARIZACION

Las propiedades de materias primas botánicas no son constantes. El clima, u otras condiciones a la que están expuestas las plantas, pueden causar diferencias por ejemplo en madurez. Aún más, variaciones durante el pretratamiento de la materia prima pueden introducirse. Para mantener una calidad constante, los fabricantes de pectina pueden mezclar diferentes lotes. También, la pectina prevista para alimentos es típicamente mezclada con sucrosa para alcanzar un grado uniforme (“fuerza”). Pectinas sin azúcar mezclado (para propósitos farmacéuticos) está disponible por los fabricantes. Dado el gran potencial de variación incontrolable, no es posible asegurar lote a lote, consistencia con respecto a todas las posibles propiedades a la vez. La composición promedio de las pectinas extraídas, antes de la estandarización está dada en el cuadro 2.4

Cuadro 2.4 Características típicas de pectinas comerciales

Acido galacturónico	> 65% (típicamente 75-80%)
Grado de metilación	30 – 75 %
Grado de acetilación	< 5 (excepto por ej. pectina de remolacha)
Grado de amidación	0 – 25 %
Azúcares neutros	< 15 %
Proteínas (N x 6.25)	< 5 %
Peso molecular	100,000 - 200,000

Fuente: Thibault y Ralet (2003)

2.9 Aplicaciones y usos de la pectina.

2.9.1 En industria alimenticia.

Tradicionalmente las pectinas se utilizan en la industria alimenticia como agentes gelificantes y espesantes. Suelen ser componentes habituales de productos como mermeladas, jaleas, productos lácteos. Actualmente las pectinas también se utilizan como fibras nutricionales y para la producción de proteína unicelular (Takur et al., 1997).

Las pectinas de baja metilación pueden usarse en productos bajos en azúcar, como los dietéticos, también en confitería, La reversibilidad con el calor de los geles de pectina de bajo metoxilo los hacen útiles para cubiertas en pastelería, glaseados, usos en microondas, productos congelados etc.

2.9.2 En industria farmacéutica.

Las pectinas se utilizan también en el sector farmacéutico como agentes detoxificantes, siendo conocidas por sus efectos antidiarréicos. La pectina en forma de carbohidrato coloidal actúa como lubricante en los intestinos al recubrir la mucosa con polisacáridos y promover el peristaltismo sin causar irritación, siendo adecuada como aditivo en la comida de bebés. La pectina reduce la toxicidad de algunos fármacos y prolonga su actividad sin disminuir los efectos terapéuticos. Los microglóbulos de pectina gelatinizada pueden también utilizarse en quimioterapia de cánceres localizados, tiene utilidad como sistema de liberación intravascular de fármacos (Hoondal *et al*, 2002). También en productos cosméticos como geles y pastas.

La habilidad de interactuar con diferentes iones divalentes metálicos, lo vuelve un fuerte agente detoxificante, se ha demostrado que las pectinas son eficientes removiendo plomo y mercurio del tracto digestivo y órganos respiratorios.

2.9.3 Otras aplicaciones.

Recientemente, se ha incrementado su utilización tanto como fuente de energía, como de materia prima para procesos industriales (Pérez et al., 2000). En la industria del tabaco, especialmente la pectina de remolacha se usa como un adhesivo natural para envolver los cigarrillos y cigarrillos. Se pueden producir filtros cerámicos con pectinas con una estructura homogénea de poro. Aún en la producción de plásticos, las pectinas se vuelven más importantes.

2.10 Demanda de pectina en El Salvador.

Debido a que no se produce pectina en El Salvador, la demanda se satisface con las importaciones de esta. La cantidad en kilogramos y el valor en dólares de las importaciones acumuladas de pectinas como materias pécticas, pectinatos y pectatos de El Salvador para los años 2000 – 2006 se presenta en el cuadro 2.5 según estadísticas del Ministerio de Economía.

Cuadro 2.5 Importaciones de pectina en El Salvador años 2000 – 2006

Año	Cantidad (kg)	CIF US\$
2000	58472	21771
2001	27729	93865
2002	21375	141650
2003	22682	237565
2004	13222	134389
2005	31391	328381
2006	27902	301218

Fuente: Ministerio de Economía

Del cuadro 2.5 puede concluirse que el comportamiento de las importaciones tiene fluctuaciones marcadas, desde el año 2000 con 58,472 kg importados como valor máximo hasta 13,222 kg en el año 2004, para luego subir en 2005 y bajar ligeramente en el 2006. Sin embargo, se tiene que el valor CIF (costo, seguro y flete) de las importaciones tiene una clara tendencia al aumento.

Los países de los cuales se importa esta pectina se muestran en cuadro 2.6. Como puede observarse, de acuerdo con la información, los principales son Estados Unidos y Francia, para el resto hay variaciones considerables en las cantidades y a lo largo del tiempo.

Cuadro 2.6 Importaciones de pectina en El Salvador por país de origen años 2000 – 2006 en kilogramos

PAIS	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
ESTADOS UNIDOS	18928	18804	10390	2537	1127	1190	
MEXICO	26214	978		214	316	207	101
GUATEMALA	50				112	228	1229
BRASIL	100			50			
ALEMANIA OCC.	86	520	1859	6086	175	18496	6748
DINAMARCA	311	661		532	2762	3374	9448
FRANCIA	12743	3192	6192	12500	3793	7476	10122
SUIZA		169	249	583	530	106	
CANADA		25					
INDIA			175		100		
CHINA CONTIENTAL			1		52		
JAPON				100			
PUERTO RICO				50	125	212	
BELGICA					4130		
NORUEGA							102
OTROS		3380	2509			102	152

Fuente: Ministerio de Economía

3.0 ESTUDIO EXPERIMENTAL PARA EXTRACCION DE PECTINA DE AGUAS MIELES DEL BENEFICIADO DE CAFE

Generalmente, las pectinas se extraen de residuos cítricos y de manzanas mediante un proceso fisicoquímico en múltiples etapas, caracterizado por una extracción con ácido mineral en caliente y se recupera con una precipitación con alcohol. Se obtuvo pectina de las aguas mieles del desmucilaginado mecánico del café mediante la adaptación del método utilizado para la producción a partir de materiales vegetales tradicionales, pero considerando que se conoce poco acerca de esta extracción, se investigó la influencia de los parámetros pH, temperatura y tiempo en el rendimiento.

3.1 Variables del proceso para la extracción de pectina

a) Variedad de café

Será una variable fija para la serie de ensayos a realizar, la variedad a utilizar es Bourbon que crece aproximadamente a más de 1200 msnm, siendo éste, café de estricta altura.

b) Método de almacenamiento de materia prima

Debido a la necesidad de realizar algunos de los experimentos en tiempo fuera del beneficiado, se debe encontrar una manera de almacenar el volumen de muestra que se utilizará para realizar los ensayos. Además, por ser aguas ricas en azúcares tiene la desventaja que fermenta con rapidez por los microorganismos que se encuentran de forma natural en el fruto del cafeto, y son arrastrados en el agua junto con el grano despulpado.

El método de almacenamiento también lo será de conservación ya que busca inhibir la acción microbiana que produce la fermentación transformando los azúcares en productos alcohólicos y luego ácidos. La naturaleza líquida de la muestra hace más difícil el almacenamiento de la misma, por lo que se realizarán pruebas para ver el

efecto del método de almacenamiento en el rendimiento de extracción para todas las demás condiciones fijas. Una vez se defina un método como el más adecuado para conservarla esta será una variable fija para la realización de los ensayos siguientes.

c) Tipo y concentración del ácido

De los ácidos minerales comúnmente usados a nivel industrial para extracción de pectina están entre otros, el H_2SO_4 , HNO_3 , HCl. Artículos publicados recientemente recomiendan el uso de ácido clorhídrico y nítrico (Canteri-Schemin, et. al. 2005). Se escoge el ácido clorhídrico por ser de los más utilizados, de bajo costo, y de relativo menor riesgo para su manejo. Además ayuda en la remoción de los materiales que componen las cenizas. La concentración del mismo se fija en HCl 1:1

d) Concentración de alcohol

La pectina puede precipitarse del medio con alcohol. Según la FAO y USP están permitidos el metanol, etanol e isopropanol, para fines de consumo humano, es decir está limitado a aquellos compatibles en aplicaciones alimenticias, que precipitan efectivamente la pectina y a la vez disuelven los materiales solubles en alcohol. Se escoge el etanol por presentar ventajas tales como no ser tóxico, de relativo bajo costo, y es posible recuperarlo de la solución por técnicas tales como la destilación para reutilizarlo, que es como se hace a nivel industrial para pectinas de origen cítrico y de manzana.

El uso de concentraciones bajas de etanol puede ocasionar dificultades en la filtración del precipitado, además, si la proporción de materiales no pécticos en la muestra es muy elevada, se necesitará precipitación preliminar con alcohol de concentración alta para remover la cantidad inicial de materiales no pécticos (Kertesz, 1951). La concentración de alcohol etílico utilizada para la precipitación de la pectina será de 70% y 90% v/v y para la purificación de la misma se utilizará al 60% v/v.

Los lavados con etanol son necesarios para remover impurezas del precipitado péctico que son solubles es el mismo. Pueden hacerse de dos a tres lavados con etanol de baja concentración y un lavado final con alcohol de concentración más alta.

e) Relación volumen etanol : solución de pectina

La proporción en volumen etanol:solución de pectina necesaria para precipitarla, depende en gran medida de la concentración de etanol a utilizar, para concentraciones de 70%v/v en adelante es por lo general 1:1, por lo que se tomará la misma para los ensayos a realizar.

f) Temperatura de extracción

Será una de las variables cuyo efecto se desea sobre el rendimiento, las altas temperaturas (mayores a 80°C) tienden a demetilar la pectina cuando se sostienen por períodos prolongados de tiempo, dando como resultado pectinas con pobres características gelificantes, la velocidad de demetilación se incrementa con la temperatura, cuando éstas condiciones se combinan con pH muy bajos (cerca de 1) se tiene también depolimerización de la misma disminuyendo su peso molecular promedio (Constenla y Lozano, 2003).

g) pH

Es la siguiente variable de investigación, como se mencionó en la sección de las propiedades químicas, las pectinas disueltas experimentan desesterificación y depolimerización en sistemas acuosos; en medio ácido los valores de pH utilizados para la extracción varían según la materia de la cual se extraen.

En general valores de pH extremadamente bajos tienden a bajar la calidad de la pectina obtenida cuando se combina con un tratamiento a alta temperatura por tiempos mayores a 60 minutos (Constenla y Lozano, 2003).

El pH de mayor estabilidad es cercano a 4 por lo que es necesario luego de la extracción subir el pH a este valor, para evitar posterior degradación de la pectina.

h) Tiempo de extracción.

Otra de las variables que se estudiarán para ver su efecto en el rendimiento de pectina obtenida, es el tiempo de la etapa hidrólisis ácida en medio acuoso. Los rangos de tiempos son variados dependiendo de la materia prima utilizada para la extracción y el tipo de pectina que se desea obtener. Los tiempos de prueba se seleccionan en base a

resultados documentados de extracciones de pectina, donde se estima intervalos con buenos resultados para el producto.

i) Temperatura y tiempo de secado.

Debido a que la temperatura afecta la velocidad de demetilación y las características del producto, no debe secarse la pectina a altas temperaturas, lo recomendable es secar en horno de vacío a temperatura baja de (30 – 40)°C y (10 – 15) psi, pero como no se cuenta con uno de este tipo se fijará la temperatura de secado en 50°C en horno con ventilación, hasta que se seque por obtención de peso constante. Si se coloca el gel de pectina en capas delgadas esta se secará en un tiempo menor. Esto es importante para no someter el producto innecesariamente a calentamiento prolongado durante el secado, de modo que lo deteriore por la alta temperatura.

3.2 Diseño experimental

La etapa experimental se ha dividido en las siguientes partes:

1. Conservación de las aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico.
2. Diseño experimental para la evaluación del rendimiento de extracción de pectina en aguas mieles para tres factores (pH, tiempo y temperatura) en tres niveles (alto, medio y bajo)

En función de la información que se desea conocer, organizaron los experimentos. Todos se realizaron a presión atmosférica. Las condiciones de la extracción se mantuvieron constantes para las variables fijas; las de investigación se tomaron con exactitud, para la temperatura se acepta una variación de $\pm 1^\circ\text{C}$, en la medición del tiempo ± 1 minuto y para el pH de ± 0.01 . En cada prueba se trabajó con un volumen de muestra de inicial de 250 ml aunque posteriormente se fijó en 500ml de agua miel libre de sólidos gruesos, para el diseño propuesto. La lectura de grados Brix se realizó con un refractómetro manual, el cual es menos exacto en las mediciones que un refractómetro Abbe, sin embargo, es útil para tener una estimación del valor.

3.2.1 Toma de muestras

Las muestras de aguas mieles se obtuvieron de la corriente de salida de tres desmucilagadores mecánicos tipo DELVA 7500 como se muestra en la figura 3.1 de un beneficio de café ubicado en el departamento de Santa Ana para la cosecha 2007/2008.



Figura 3.1 Serie de desmucilagadores mecánicos tipo DELVA

Fuente: Beneficio Cooperativa Cuzcachapa de R.L

Se recolectaron con ayuda de embudo plástico en recipientes de Polietileno nuevos y limpios, con se ve en figura 3.2, se taparon e introdujeron rápidamente en hielo suficiente para evitar descomposición de la misma y posteriormente se trasladaron al laboratorio. Si la muestra se tomó durante el beneficiado nocturno, ésta luego de recolectada se guardó inmediatamente en refrigeración hasta su traslado al laboratorio al día siguiente, durante el cual se mantuvo en hielera para evitar deterioro de las aguas mieles. En caso de no trabajarla en el momento se debía conservar por un método adecuado



Figura 3.2 Agua miel procedente de desmucilagado mecánico

Los primeros ensayos fueron realizados para tener un acercamiento al método de extracción, ver posibles dificultades, y ayudaron a orientar las pruebas siguientes. Por tanto, se desarrollaron algunas variaciones al procedimiento de experimentación en función de los resultados obtenidos y los recursos materiales con los que se contaba, tratando de aproximarse a las etapas del proceso industrial de extracción a partir de otras fuentes vegetales pero utilizando material de laboratorio que se detalla en anexo 6. El método empleado fue modificado del presentado por D'Addosio, et al., (2005); Yapó et al. (2007), Lozano e Iglesias, (2004); Canteri-Schemin, et al. (2005). El procedimiento que se llevó a cabo se ilustra en anexo 7 y 8 y se describe a continuación.

- 1. Selección y recolección de la muestra.** En un beneficio de café que utilice desmucilaginosos mecánicos, tomar de la corriente de salida el residuo líquido (agua miel), en recipiente de plástico, colocar el recipiente bien cerrado dentro de un depósito hermético con suficiente hielo para evitar la descomposición y trasladarla al laboratorio. En anexo 7 se muestra la técnica.
- 2. Preparación de la muestra.** Separar por filtración los sólidos gruesos que puedan encontrarse tales como pulpa, ramitas, granos de café. Esto puede hacerse con un colador plástico.
- 3. Características de la muestra.** Anotar la variedad de café de la cual procede el agua miel. Medir temperatura, pH, densidad y °Brix de la muestra ya preparada. Observar el color, olor y consistencia de la misma.
- 4. Hidrólisis en solución acuosa caliente en medio ácido.** Colocar en un beaker 250ml de la muestra ya preparada, agregar 100ml de agua destilada. Llevar a pH=3.0 con HCl 1:1. Calentar la muestra a T=60°C agitando a velocidad media por un tiempo $t = 30$ min. Al finalizar el tiempo de extracción subir el pH a 4.0 con NaOH 1N, agitar bien y enfriar a temperatura 40°C.

- 5. Separación del mucílago.** Filtrar con bomba de vacío para separar el sólido (con restos de mucílago) del extracto (líquido), la primera filtración puede hacerse con una manta gruesa para retirar la mayor parte del residuo sólido; la segunda filtración, con una manta muy fina doblada en dos, y finalmente con papel filtro Whatman 41. Recolectar el filtrado y medir el volumen en probeta, posteriormente traspasarlo a un beaker.
- 6. Precipitación de la pectina con alcohol.** Agregar alcohol etílico al 70% en proporción 1:1 con agitación constante por 5 a 10 minutos, dejar reposar 15 minutos luego centrifugar 5 minutos a velocidad media y decantar el líquido sobrenadante. Tapar y dejar reposar el líquido claro 12 a 24 horas hasta observar un coágulo de amarillento a blanquecino distribuido en la fase líquida.
- 7. Purificación de la pectina.** Filtrar el gel obtenido utilizando filtro de vacío o centrifuga a velocidad media (1500 rpm) por 10 minutos, lavar 2 veces el coágulo con 25ml etanol 60% para eliminar impurezas.
- 8. Reprecipitación.** Después de haber filtrado el gel anterior, tomar un volumen pequeño del extracto residual y añadirle igual cantidad de etanol al 90%; si había quedado pectina en la solución remanente, esta precipitará inmediatamente o al dejarla en reposo cerca de 2 horas si la cantidad es mínima. Si esto sucede, agregar a la solución restante etanol al 90% en proporción 1:0.5, aplicarle a este gel los mismos lavados con etanol. Unir ambos productos.
- 9. Secado de la pectina purificada.** Extender el coágulo en una superficie resistente al calentamiento y secarlo en estufa con ventilación a 65°C por 2 horas o hasta sequedad. En caliente raspar la película de la superficie con una espátula y luego pesar el producto.
- 10. Determinación del rendimiento de pectina.**

$$\text{Rendimiento de pectina} = (\text{g pectina} / \text{litro de agua miel})$$

11. Almacenamiento. Guardar en frasco de vidrio limpio, tapado herméticamente, a temperatura ambiente en lugar seco.

Las muestras de agua miel recolectada tienen las características mostradas en el cuadro 3.1 y los resultados de los ensayos practicados a dichas muestras en las que se pudo obtener pectina se reportan en la cuadro 3.2. En figura 3.3 se muestra la pectina obtenida experimentalmente, el precipitado de pectina se observó como un gel flotante en el medio líquido, que al separarlo del extracto residual tenía la apariencia de un gel entre amarillento a blanquecino.

Cuadro 3.1 Características del agua miel proveniente de desmucilaginado mecánico.

Muestra Nº	pH	Temperatura (°C)	°Brix	Densidad (g/ml)	color	olor
1	5.00	12°C	2	0.9757	Café	A pulpa fresca de café
2	5.13	14°C	2	0.9933	Café	A pulpa fresca de café

Cuadro 3.2 Resultados obtenidos en las pruebas preliminares.

Muestra Nº	Volumen (ml)	Peso de pectina obtenida (g)	Rendimiento (g/l)
1	250	0.13	0.52
2	250	0.20	0.80

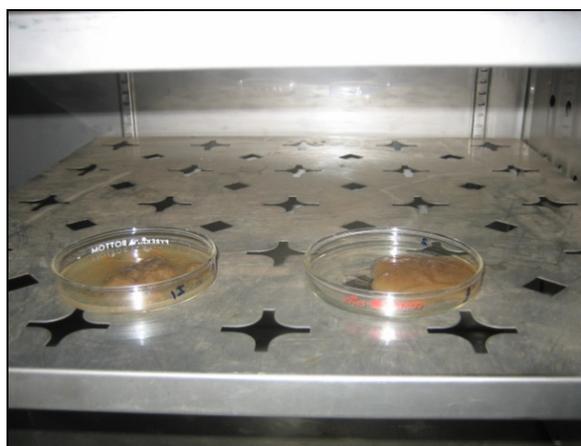


Figura 3.3 Coágulo de pectina obtenida experimentalmente

De estos ensayos se obtuvo información importante como:

- El agua miel fermenta con gran rapidez cuando se encuentra a temperatura ambiente (26°C - 29°C), por lo que se mantenía en refrigeración (8°C) cuando no se iba a procesar. Además, no debe llenarse completamente el recipiente en que se almacenará, pues en caso de no mantener la temperatura baja de forma prolongada, la presión del gas acumulado puede hacer que el agua salga en chorro al destapar la botella.
- La agitación durante la hidrólisis ácida no debía ser brusca ya que dificultaba la filtración, esto es porque el movimiento a alta velocidad reduce el tamaño de las partículas, haciendo necesarias más filtraciones para poder separar los residuos sólidos y aún así no se lograba separar adecuadamente.
- Es preferible realizar la primera filtración en caliente para facilitar la separación de los residuos sólidos, y luego bajar la temperatura. Sin embargo, el proceso experimental de filtración tomaba demasiado tiempo, debía enfriarse rápido para evitar mantener la temperatura alta cuando ya se había extraído la pectina de las suspensión porque podría afectarla de alguna manera.
- En la primera filtración se removía la mayor cantidad de materia sólida, debía hacerse necesariamente con una manta de poro algo grueso utilizando la bomba de vacío o mediante presión manual (exprimido); en la segunda se eliminó la materia que no pudo filtrarse con ningún papel filtro, pero es más fina que la anterior; y en la tercera, que podía hacerse repetidas veces según el tamaño de las partículas aún suspendidas y que le dan el color oscuro, puede utilizarse una centrífuga o papel filtro Whatman 41 para separarlas hasta lograr un líquido color amarillo claro. Es posible que con una centrífuga de alta potencia se hagan menos filtraciones, sin embargo, esto no pudo probarse ya que no se contaba con una de este tipo.

- Durante el calentamiento debe tenerse el cuidado que no disminuya demasiado el volumen inicial de muestra si se calienta por tiempos prolongados o a alta temperatura, para lo cual se debe restituir el agua que se pierde por evaporación.
- Los lavados con etanol al 60% v/v, remueven pigmentos e impurezas que permanecen luego de la separación del gel de pectina; se verificó que en cada lavado se aclaraba más el líquido aumentando los grados Brix de la solución alcohólica, esto es porque removía a la vez azúcares que pueden precipitar junto con la pectina.
- Al dejar en reposo la solución alcohólica de pectina para la precipitación, debe taparse bien para evitar evaporación del etanol y porque el olor atrae insectos que pueden caer en ella.
- La temperatura de secado debe ser lo más baja posible ya que las altas temperaturas tienden a cambiar el color del producto final oscureciéndolo.
- Una vez seco el producto, rasparlo en caliente de la superficie, de lo contrario será muy difícil su remoción, además, es conveniente mantenerlo en desecador, pues absorbe la humedad del ambiente adquiriendo una consistencia al tacto pegajosa y elástica.

3.2.2 Conservación de la muestra.

Para la preservación del agua miel libre de sólidos gruesos, se hicieron pruebas a escala pequeña con el propósito de ver la posibilidad de conservar la muestra por un período de tiempo suficiente para las experimentaciones que se necesitaban realizar, mediante un método adecuado de almacenamiento. Los tratamientos aplicados a la muestra fueron:

- a) Autoclave a 15 psi y 10 minutos, enfriamiento posterior y almacenamiento en refrigeración a 8°C.
- b) Calentamiento a 82°C por 10 minutos y enfriamiento rápido, posteriormente mantener en refrigeración de 8°C.
- c) Congelamiento de la muestra preparada en freezer.

Para ver el efecto del método de almacenamiento se mantuvieron fijas todas las demás variables del experimento. El procedimiento seguido es similar al descrito anteriormente, se aplica el tratamiento de conservación luego de separar los sólidos gruesos según cada caso.

Las condiciones de experimentación fueron: Volumen de muestra 250ml; hidrólisis a pH 3, tiempo de extracción 30 minutos, temperatura de extracción 60°C; concentración del ácido clorhídrico 1:1, concentración de etanol para precipitación 70% v/v, relación en volumen etanol:solución de pectina 1:1; concentración de etanol para purificación 60%, temperatura de secado 65°C por 3 horas en estufa con ventilación.

Se recolectaron tres muestras diferentes, una por cada tratamiento; para cada caso se tomó una porción de la muestra fresca, posteriormente se aplicó el tratamiento de conservación, y se hizo la extracción para cada caso. Se realizó de esta manera debido al tiempo que se emplea en realizar una sola extracción, pues no permite hacer todos los tratamientos a una sola muestra antes que ésta llegue a fermentarse. Las pruebas para los tratamientos de conservación se realizaron luego de 12 días de almacenamiento luego de haberlo aplicado. Se busca conocer si existía cambio significativo en el peso de producto obtenido a partir de la muestra fresca respecto de la almacenada.

En el cuadro 3.3 se describen las características del agua miel de las muestras frescas utilizadas, antes de hacer la extracción de la muestra almacenada se vuelven a tomar dichas características y se detallan en el cuadro 3.4, éstas presentan alguna variación puesto que cambia la temperatura a la cual se tomaron. En el cuadro 3.5 se mencionan

los rendimientos obtenidos de la muestra fresca y en el cuadro 3.6 los obtenidos luego del tratamiento de conservación para un almacenamiento de 2 semanas después de aplicado. En todos los casos el rendimiento se expresa en gramos de producto obtenido por litro de agua miel libre de sólidos gruesos. En las figura 3.4 se muestran las imágenes de la conservación del agua miel por los métodos descritos.

Cuadro 3.3 Características de agua miel fresca proveniente de desmucilaginado mecánico

Muestra N°	pH	Temperatura (°C)	°Brix	Densidad (g/ml)	color	olor
3	5.10	12	3	0.9748	café	a pulpa fresca de café
4	5.14	11	5	0.9755	café	a pulpa fresca de café
5	5.00	11	5.5	0.9898	café	a pulpa fresca de café

Cuadro 3.4 Características de agua miel almacenada

Muestra N°	pH	Temperatura (°C)	°Brix	Densidad (g/ml)	color	olor
3	4.9	8	3.5	0.9750	café	a pulpa de café
4	4.39	17	3	0.9746	café	a cocido y ácido
5	4.92	18	5.5	0.9924	café	a pulpa fresca de café

Cuadro 3.5 Resultados obtenidos en extracción de pectina a partir de muestra fresca

N° muestra	Volumen de muestra (ml)	Pectina obtenida (g)		Rendimiento (g/ l) *	
		Peso	Promedio		Promedio
4	250	0.16	0.140	0.64	0.56
		0.12		0.48	
5	250	0.14	0.155	0.56	0.62
		0.17		0.68	
6	250	0.13	0.125	0.52	0.50
		0.12		0.48	

*gramos de pectina por litro de agua miel libre de sólidos gruesos

Cuadro 3.6 Resultados obtenidos en pruebas de conservación después de 2 semanas

Nº muestra	Prueba	Pectina obtenida (g)		Rendimiento* (g/l)	
		Peso	Promedio		Promedio
4	autoclave a 15 psi y 10 min con refrigeración	0.15	0.18	0.60	0.72
		0.21		0.84	
5	calentamiento a 82°C y enfriamiento rápido con refrigeración a 8°C	0.08	0.058	0.32	0.22
		0.03		0.12	
6	congelamiento	0.10	0.105	0.40	0.42
		0.11		0.44	

*gramos de pectina por litro de agua miel libre de sólidos gruesos

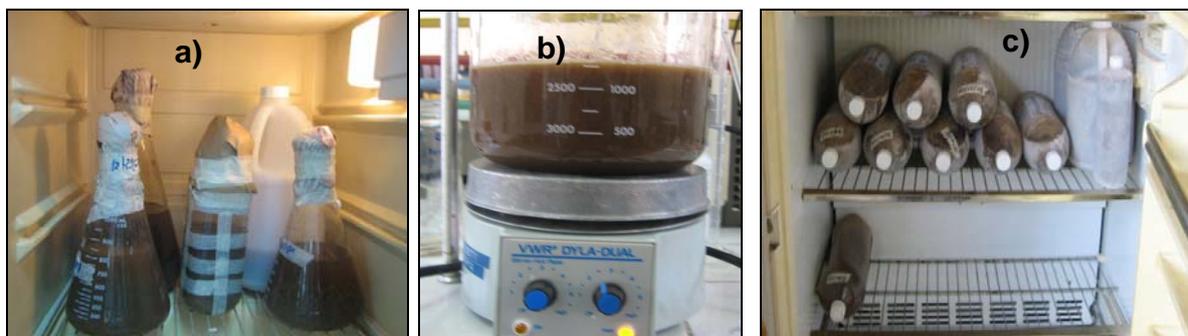


Figura 3.4 Almacenamiento de agua miel según los tres tratamientos: a) autoclave, b) calentamiento a 82°C, c) congelada

Si se considera el promedio de la muestra fresca antes de cada tratamiento, como el valor teórico esperado, se tiene que para el autoclave la diferencia entre los valores es del 22.22% positiva, es decir hay un incremento en el mismo, para el calentamiento a 82°C es 181.8% negativa, con una reducción significativa del rendimiento y para el congelamiento es de 19.05%. De los tres tratamientos los más adecuados resultaron ser autoclavar la muestra y congelarla (tratamientos a y c), por presentar relativamente poco cambio durante el periodo de almacenamiento.

El autoclave a 15 psi y 10 minutos presentó la ventaja de hacer más fácil la filtración al separar los residuos sólidos de la pectina en solución, el color de la pectina obtenida es

café ligeramente claro. Es posible obtener pectina con esta forma de almacenamiento para un tiempo de 2 meses a partir de realizado el tratamiento mientras no se contamine, una vez se abre el recipiente es recomendable no manipularlo demasiado para no introducir microorganismos del ambiente que puedan llegar a crecer dentro de la suspensión estéril. La cantidad de muestra a utilizar se trasfiere hasta el momento de hacer los ensayos y tapar rápidamente, de ser posible realizar la transferencia de las porciones de volumen en cámara de flujo laminar o entre el espacio de 2 mecheros encendidos.

El calentamiento a 82°C con enfriamiento rápido y refrigeración a 8°C (tratamiento b) presentó la desventaja que para un tiempo de almacenamiento mayor a 2 semanas ya no es posible extraer pectina. Se acumuló gran cantidad de gas en el recipiente que la almacenaba y se percibía un fuerte olor a vinagre, el pH disminuye hasta un valor de 3.4 indicando que se han convertido los azúcares del agua miel a productos ácidos de la fermentación, en la figura 3.5 se puede observar un burbujeo abundante que indica la actividad de la fermentación.



Figura 3.5 Agua miel calentada a 82°C y refrigerada a 8°C después de 20 días de almacenamiento

Además presentó la desventaja de que el coágulo formado es bastante disperso y poco consistente, lo que hizo difícil la precipitación de la solución, aún utilizando centrífuga por 40 minutos, hubo porciones suspendidas que no se pudieron recuperar. Esto es posiblemente porque llevar a la temperatura de 82°C toma bastante tiempo utilizando

un hot plate, es decir no es un calentamiento rápido y el tiempo se midió a partir de que alcanzó dicha temperatura, además no se pudo enfriar tan rápido como hubiese sido necesario afectando de manera significativa la estructura de la pectina haciendo muy difícil su recuperación.

El congelamiento del agua miel debe hacerse con un gran cuidado, se debe tratar de mantener la temperatura lo más baja posible desde que se recolecta la muestra hasta que llegue al punto de congelación (con baño de hielo), puesto que se trata de inhibir la descomposición de la misma bajando la temperatura, para detener el proceso de fermentación por acción microbiana. Este presenta la ventaja de que puede almacenarse el agua por 3 meses para poder realizar los ensayos necesarios, descongelando las porciones que se van a utilizar en el momento de hacer las pruebas. Para esto es necesario congelar volúmenes de agua miel en recipientes pequeños para que sean fáciles de manejar. Este procedimiento puede combinarse con el autoclave, es decir, la muestra congelada puede descongelarse, luego pasarla por autoclave y refrigerarla a 8°C y aún se puede extraer pectina de la muestra original del agua miel.

En la figura 3.6 se puede observar la diferencia de los coágulos de pectina según los tres tratamientos de conservación aplicados, el coágulo más consistente es el que se obtiene de la muestra que se congeló, y que tiene un gran parecido al que se obtiene a partir de la muestra fresca incluso en el momento de procesarla.

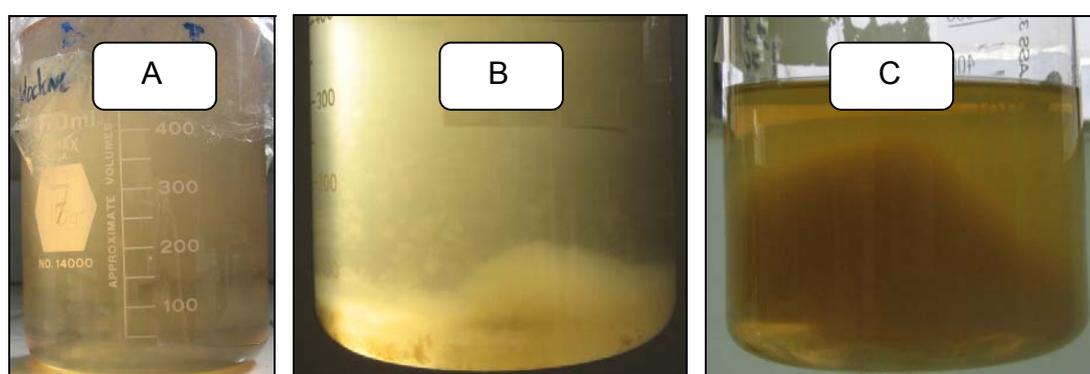


Figura 3.6 Coágulos de pectina obtenidos para las muestras almacenadas según los tres tratamientos: A) autoclave, B) calentamiento a 82°C, C) congelada

Para las pruebas de la etapa del diseño experimental se utilizó por tanto el congelamiento en freezer de la muestra como método de conservación y almacenamiento.

3.2.3 Diseño de experimentos y obtención de datos experimentales.

Para el diseño del experimento se estudiará en cuenta el efecto de tres variables que afectan el rendimiento de extracción de pectina:

- a) Temperatura.
- b) pH.
- c) Tiempo.

Se tomaron estas variables como los efectos de investigación considerando tres niveles de intensidad para cada uno de estos efectos. Para este tipo de experimentos puede utilizarse el “Diseño de Box-Behnken”, que presenta una razonable alternativa a los diseños de composición centrales cuando el experimentador desee correr solo tres niveles de los factores y todavía quiera un diseño que este cerca de la rotabilidad, presenta la ventaja que es más adecuado a la disposición de pruebas a realizar y además es lo recomendable para experimentos de más de 3 factores en 3 niveles de intensidad, porque reduce considerablemente el número de ensayos .

Este diseño consiste en realizar corridas en las cuales cada par de factores se varía entre sus niveles altos y bajos, mientras los otros factores experimentales se mantienen a nivel medio. Por ejemplo, un diseño de Box-Behnken, con tres puntos centrales se muestra en la cuadro 3.7. Estos puntos centrales proveen grados de libertad adicionales para estimar el error, mantienen la ortogonalidad del diseño y permiten estimar el efecto de los términos cuadráticos puros.

Cuadro 3.7 Diseño de Box-Behnken de tres variables

Corrida	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

X_i : variable de investigación

Representado de manera geométrica este diseño se observa de la manera que muestra la figura 3.7, los puntos se ubican en medio de las aristas del cubo centrado en el origen y no incluye los tratamientos de los vértices que en algunas situaciones experimentales resultan extremas y no se pueden correr.

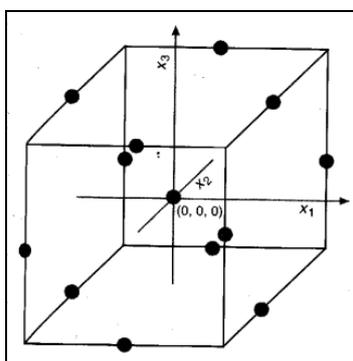


Figura 3.7 Diseño de Box-Behnken, con puntos centrales

Fuente: Gutiérrez y de la Vara (2008)

Los diseños de Box-Behnken es uno de los mas comunes para optimización de respuestas. La metodología de superficies de respuesta es una combinación de técnicas de diseño y análisis de experimentos que, utilizadas en forma secuencial, permiten determinar condiciones de operación que son óptimos locales para el sistema. Usualmente se aplica en una investigación, cuando ya se ha reducido el número de variables (Gutiérrez y de la Vara, 2008).

3.3 Extracción de pectina de aguas mieles del desmucilaginado mecánico

Una vez obtenida la cantidad de aguas mieles necesaria para realizar los ensayos y antes de tomar algún volumen para su análisis, debe mezclarse bien el contenido mediante agitación, debido al largo tiempo que requiere la extracción, se efectúa una extracción para cada combinación de los parámetros experimentales (temperatura, pH y tiempo), según el orden dado para los ensayos repitiéndose posteriormente las extracciones que presentaron valores anómalos.

3.3.1 Procedimiento experimental para la extracción de pectina a partir de aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico

Se siguen las etapas que a continuación se describen:

- 1. Características de la muestra.** Anotar la variedad de café de la cual procede el agua miel. Medir temperatura, el pH, la densidad y los °Brix de la muestra ya preparada.
Observar el color, olor y consistencia de la misma.
- 2. Hidrólisis en solución acuosa caliente en medio ácido.** Colocar en un beaker 500ml de la muestra preservada (libre de sólidos gruesos). Según la combinación de parámetros a evaluar, llevar la suspensión a pH_i con HCl 1:1. Calentar la muestra a T_i agitando a velocidad media por un tiempo t_i. Al finalizar el tiempo

de extracción subir el pH a 4.0 con NaOH 1N, agitar bien y enfriar a temperatura 35°C.

- 3. Separación del mucílago.** Filtrar con bomba de vacío para separar el sólido (con restos de mucílago) del extracto (líquido), la primera filtración puede hacerse con una manta gruesa para retirar la mayor parte del residuo sólido; la segunda filtración, con una manta muy fina, y finalmente con papel filtro Whatman 41. Recolectar el filtrado y medir el volumen en probeta, posteriormente traspasarlo a un beaker.
- 4. Precipitación de la pectina con alcohol acidificado.** Agregar alcohol etílico al 70% en proporción 1:1 con agitación constante por 5 a 10 minutos, dejar reposar 15 minutos luego centrifugar 5 minutos a velocidad media y decantar el líquido sobrenadante. Tapar y dejar reposar el líquido claro 12 a 24 horas hasta observar un coágulo blanquecino.
- 5. Purificación de la pectina.** Filtrar el gel obtenido utilizando filtro de vacío o centrifuga a velocidad media (1500 rpm) por 10 minutos, lavar 2 veces el coágulo con 25ml etanol 60% para eliminar impurezas.
- 6. Reprecipitación.** Después de haber filtrado el gel anterior, tomar un volumen pequeño del extracto residual y añadirle igual cantidad de etanol al 90%; si había quedado pectina en la solución remanente, esta precipitará inmediatamente o al dejarla en reposo cerca de 2 horas si la cantidad es mínima. Si esto sucede, agregar a la solución restante etanol al 90% en proporción 1:0.5, aplicarle a este gel los mismos lavados con etanol. Unir ambos productos.
- 7. Secado de la pectina purificada.** Extender el coágulo en una superficie y secarlo en estufa con ventilación a 50°C por 2 horas o hasta sequedad, en caliente raspar la película de la superficie y luego pesar el producto.

8. Determinación del rendimiento de pectina.

$$\text{Rendimiento de pectina} = (\text{g pectina} / \text{litro agua miel})$$

9. Almacenamiento. En frasco de vidrio limpio, tapado herméticamente, a temperatura ambiente en lugar seco.

10. Repetir. Para distintos valores de pH, temperatura y tiempo de extracción según cuadro 3.10. En esta se espera ver el efecto de las tres variables en el rendimiento de extracción de pectina.

Los valores de temperatura, pH y tiempo de extracción para los distintos niveles que se evaluaron se muestran en el cuadro 3.8

Cuadro 3.8 Factores y niveles para el diseño experimental

Nivel	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
Factores			
Temperatura	50°C	60°C	70°C
pH	2.5	3.0	3.5
Tiempo	20 min	40 min	60 min

Se creó un diseño de Box-Behnken para estudiar los efectos de los 3 factores en 15 corridas, incluyendo 3 puntos centrales por bloque. El diseño se ejecutó en un solo bloque, donde el orden de los experimentos es completamente aleatorio. El diseño creado se muestra en el cuadro 3.9 en la cual se estimará la variable respuesta, rendimiento (última columna de la derecha), como función de cada factor experimental (temperatura, pH y tiempo). En cada experimento el factor de interés se varía desde su nivel bajo hasta su nivel alto, mientras todos los demás factores se mantienen constantes en sus valores centrales.

Cuadro 3.9 Diseño de Box-Behnken para evaluación del rendimiento de pectina

Bloque	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (minutos)	Rendimiento (g/l) *
1	-1	0	1	
1	0	0	0	
1	1	1	0	
1	-1	-1	0	
1	1	0	1	
1	0	-1	1	
1	0	0	0	
1	0	0	0	
1	1	-1	0	
1	-1	1	0	
1	-1	0	-1	
1	0	1	-1	
1	0	1	1	
1	0	-1	-1	
1	1	0	-1	

*gramos de pectina/ litro de agua miel libre de sólidos gruesos

Sustituyendo los valores dados en cuadro 3.8 en el diseño del cuadro 3.9 se tienen las condiciones experimentales para cada ensayo, donde la última columna mostrará el efecto en la variable respuesta, rendimiento de pectina, de la combinación de las tres variables de investigación temperatura, pH y tiempo, es decir, los efectos como se ve en cuadro 3.10. En éste se muestran los valores codificados y reales para cada variable de investigación.

Cuadro 3.10 Diseño de Box-Behnken con niveles reales y codificados

Corrida	Temperatura (°C)		pH		Tiempo (min)	
	real	codificado	real	codificado	real	codificado
1	50	-1	3.0	0	60	1
2	60	0	3.0	0	40	0
3	70	1	3.5	1	40	0
4	50	-1	2.5	-1	40	0
5	70	1	3.0	0	60	1
6	60	0	2.5	-1	60	1
7	60	0	3.0	0	40	0
8	60	0	3.0	0	40	0
9	70	1	2.5	-1	40	0
10	50	-1	3.5	1	40	0
11	50	-1	3.0	0	20	-1
12	60	0	3.5	1	20	-1
13	60	0	3.5	1	60	1
14	60	0	2.5	-1	20	-1
15	70	1	3.0	0	20	-1

Las características del agua miel utilizada para estas corridas experimentales son las detalladas en el cuadro 3.11 para el tratamiento de conservación que se escogió como el más conveniente, es decir el congelamiento del agua miel libre de sólidos gruesos.

Cuadro 3.11 Características del agua miel proveniente de desmucilaginado mecánico

Muestra N°	pH	temperatura	°Brix	densidad	Color	Olor
6	5.5	10°C	4	0.9451 g/ml	Café	A pulpa fresca de café

Los resultados experimentales según el procedimiento de extracción de pectina descrito para este diseño se muestran en cuadro 3.12

Cuadro 3.12 Resultados obtenidos en las pruebas de extracción de pectina aguas mieles provenientes de desmucilaginado mecánico.

Corrida	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (minutos)	Rendimiento (g/l)
1	50	3.0	60	0.24
2	60	3.0	40	0.84
3	70	3.5	40	2.2
4	50	2.5	40	0.6
5	70	3.0	60	1.6
6	60	2.5	60	0.28
7	60	3.0	40	0.64
8	60	3.0	40	1.5
9	70	2.5	40	0.57
10	50	3.5	40	0.2
11	50	3.0	20	0.02
12	60	3.5	20	0.04
13	60	3.5	60	0.82
14	60	2.5	20	0.48
15	70	3.0	20	0

3.4 Análisis fisicoquímico para pectina extraída.

Para realizar el análisis físico-químico de calidad de la pectina obtenida, se utilizará la metodología descrita en el anexo 10 por The Unites States Pharmacopeia (USP) para pectina de origen cítrico y de manzana.

Las determinaciones realizadas a la pectina son: Identificación, ensayo para grupos metóxilo, ensayo para ácido galacturónico, acidez, humedad y solubilidad. Existen otras pruebas requeridas como se indican en el anexo 9, pero por la falta de recursos solo se realizaron las anteriormente mencionadas.

3.4.1 Métodos de identificación.

Consisten en pruebas cualitativas, el procedimiento seguido es el que se describe en la farmacopea de los Estados Unidos (USP) y que se presenta en el anexo 10.1. Al realizar las pruebas se encontró que da resultados positivos para los ensayos practicados, las observaciones se resumen en el cuadro 3.13

Cuadro 3.13 Pruebas de identificación de la pectina obtenida

Prueba	observación	resultado
a) Solución de pectina más etanol	Precipitado gelatinoso y traslucido	positiva
b) Solución de pectina más NaOH 2N	Gel transparente	positiva
c) Gel de prueba b) más HCl 3N	Precipitado gelatinoso incoloro	positiva

3.4.2 Número de metoxilo.

La metodología de análisis químico se fundamenta en una valoración volumétrica ácido base, la pectina presenta grupos carboxílicos libres y puede por tanto formar sales. La determinación del número de metoxilo se basa en el análisis cuantitativo del álcali requerido para la saponificación de un éster. El procedimiento se detalla en anexo 10.2 Según la USP la pectina debe tener al menos 6.7% de grupos metoxilos y 74% de ácido galacturónico. El máximo porcentaje de grupos metoxilos es 14%, la pectina HM se encuentra de 7% a 14%. Las que poseen menos de 6.7% corresponden a las LM y son las de baja esterificación.

3.4.3 Porcentaje de ácido galacturónico

En el cuadro 3.14 se muestran los volúmenes obtenidos en la valoración de pectina según el procedimiento de la USP y que se describe en el anexo 10.3

Cuadro 3.14 Volúmenes obtenidos en la valoración de pectina obtenida

Nº	Valoración inicial	Valoración de saponificación	Valoración total
1	2.8 ml	1.7 ml	4.5
2	2.7 ml	1.65 ml	4.35

Cuadro 3.15 Porcentaje de grupos metoxilo y ácido galacturónico de pectina obtenida

Nº	% metoxilo	% ácido galacturónico
1	5.89	97.5
2	6.17	93.21

3.4.4 Acidez.

La determinación de la acidez es un parámetro de calidad importante porque en las preparaciones de pectina comercial se requiere especificar el pH de una solución estandarizada de pectina, aunque este no es un factor crítico. Las soluciones al 1% de pectina cítrica tienen un pH de 3.2 a 3.5, el procedimiento se muestra en anexo 10.4

Cuadro 3.16 pH de soluciones de pectina obtenida experimentalmente

Nº	pH
1	3.83
2	4.2

3.4.5 Humedad.

Es un factor importante de calidad puesto que las pectinas tienden a degradarse con el tiempo. Las pectinas con una humedad máxima de 10% son más estables durante prolongados periodos de almacenamiento. En anexo 10.5 se describe el procedimiento para el cálculo del contenido de humedad.

Cuadro 3.17 Pesos obtenidos en pruebas de humedad

Peso muestra	Peso pectina seca	%Humedad
0.5g	0.448g	10.4
0.5g	0.453g	9.4

3.4.6 Solubilidad

Esta propiedad es importante en el comercio, puesto que no se utiliza agregando directamente el polvo al alimento sino en forma de solución concentrada. Como la pectina en el agua puede formar grumos viscosos por fuera y secos por dentro, se mezcla primero con azúcar, sales amortiguadoras o se humedece con etanol o glicerol antes de añadir el agua. Para determinar si la pectina obtenida es soluble se agrega 0.5g de pectina a 100 ml de agua y se agita vigorosamente, se observa una solución coloidal, viscosa y opalescente.

4.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con los datos experimentales obtenidos en cada uno de los puntos de prueba dados por el diseño experimental, se realizó el análisis de varianza y generó la ecuación que modela al rendimiento en función de las variables de investigación.

Al extraer pectinas bajo condiciones ácidas y en caliente, muchas de las regiones conteniendo grandes proporciones de azúcares neutros son hidrolizadas, quedando principalmente las cadenas de galacturonano que son estables en ácido. Se sabe que las propiedades de la pectina dependen del grado de esterificación, longitud de la cadena. La calidad de la pectina extraída se evaluó mediante la determinación de su contenido de humedad, ácido galacturónico, grupos metoxilo, acidez, y solubilidad.

4.1 Influencia del pH, temperatura y tiempo de extracción en el rendimiento de pectina.

Para los resultados experimentales mostrados en la sección 3.4, y presentados en el cuadro 3.12, el análisis de varianza (ANOVA) tomando en cuenta todos los efectos se muestra en cuadro 4.2 y la nomenclatura utilizada en él se describe en el cuadro 4.1

Cuadro 4.1 Nomenclatura utilizada en el análisis estadístico.

Variables	Descripción	Tipo de efecto
A	temperatura	principal
B	pH	principal
C	tiempo	principal
AA	temperatura ²	cuadrático
AB	temperatura x pH	combinado
AC	temperatura x tiempo	combinado
BB	pH ²	cuadrático
BC	pH x tiempo	combinado
CC	tiempo ²	cuadrático

Cuadro 4.2 Análisis de varianza para rendimiento de pectina para un nivel de significancia de 10%.

Variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrada	Cociente F	Valor- P
A	1.36951	1	1.36951	8.49	0.0333
B	0.221113	1	0.221113	1.37	0.2944
C	0.7200	1	0.7200	4.46	0.0883
AA	0.0015391	1	0.0015391	0.01	0.9260
AB	1.03023	1	1.03023	6.39	0.0527
AC	0.4761	1	0.4761	2.95	0.1464
BB	0.0238776	1	0.0238776	0.15	0.7162
BC	0.2401	1	0.2401	1.49	0.2768
CC	0.952539	1	0.952539	5.91	0.0594
Total error	0.806492	5	0.161298		
Total (corr.)	5.82417	14			

R-cuadrado = 86.1527%

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 61.2275%

Error estándar de estimación = 0.40162

Error absoluto de la media = 0.187889

Estadístico de Durbin-Watson = 3.13528 (P=0.9326)

El cuadro 4.2 del análisis de varianza reparte la variabilidad de la respuesta rendimiento en segmentos separados para cada uno de los efectos, luego prueba la significancia estadística de cada efecto por comparación de la media cuadrada contra una estimación del error experimental. Para el caso, dos efectos tienen valores P menores a 0.1, indicando que son significativamente diferentes de cero para un nivel de confianza de 90.0%

R-cuadrado indica que el modelo explica el 86.1527% de la variabilidad en el Rendimiento de pectina. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más conveniente para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 61.2275%. El error estándar de la estimación muestra que la desviación estándar de los

residuales es de 0.40162. El error absoluto medio (MAE) de 0.187889 es el valor medio de los residuales. El estadístico Durbin-Watson prueba los residuales para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden de ocurrencia en el cuadro de datos (cuadro 3.12), donde el valor P es mayor al 10.0%, no hay indicativo de autocorrelación seria en los residuales al nivel de significancia del 10.0%.

En anexo 10 se describen los componentes del cuadro ANOVA.

La estimación del efecto de los parámetros en orden decreciente de importancia se representa mediante un gráfico de Pareto (figura 4.1), el color de las barras muestra cuando un efecto es positivo o negativo. En éste, se encuentran las contribuciones individuales, los efectos cuadráticos y las interacciones entre efectos.

El gráfico de Pareto muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud, la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, que es el efecto estimado dividido por su error estándar. Esto es equivalente al cálculo de un estadístico t para cada efecto. La línea vertical se utiliza para juzgar cuales efectos son significativos. Cualquier barra que se prolonga más allá de esa línea corresponde a efectos que son estadísticamente significativos al nivel de confianza de 90.0% En la figura 4.1 se observa que 3 efectos son significativos, A, AB y CC, es decir temperatura, temperatura-pH y tiempo².

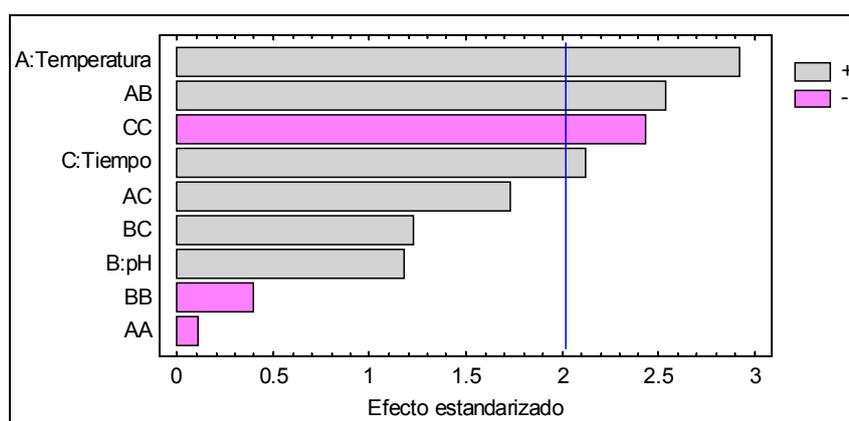


Figura 4.1 Gráfico de Pareto estandarizado para el rendimiento de pectina con un nivel de significancia de 10%.

El modelo matemático que resulta del ajuste de todos los datos contiene 3 efectos principales y 6 interacciones de dos factores, como puede observarse algunos de esos términos no son significativos estadísticamente. Al construir modelos empíricos basados únicamente en datos observados, es importante mantenerlos tan simple como sea posible, ya que son más fáciles de interpretar y de extrapolarlos a otras combinaciones de factores experimentales. Siguiendo este principio de simplicidad, pueden eliminarse efectos insignificantes del modelo ajustado según los criterios siguientes:

- Remover efectos insignificantes de dos factores (u otros efectos de segundo orden).
- Remover efectos principales insignificantes que no están incluidos en interacciones significativas (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Es importante notar que los efectos principales que estén incluidos en interacciones significativas no deben eliminarse, de hacerlo, pondría restricciones artificiales al modelo polinómico.

A partir de los resultados del cuadro 4.2 de ANOVA, y del gráfico de Pareto se eliminan los efectos AA, BB, BC y AC. Al realizar el nuevo análisis de varianza se obtuvieron los resultados que se presentan en el cuadro 4.3

Cuadro 4.3 Análisis de Varianza de efectos más importantes en rendimiento de pectina para un nivel de significancia de 10%.

Variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrada	Cociente F	Valor- P
A	1.36951	1	1.36951	7.97	0.0200
B	0.221113	1	0.221113	1.29	0.2861
C	0.72	1	0.72	4.19	0.0710
AB	1.03023	1	1.03023	5.99	0.0369
CC	0.936002	1	0.936002	5.44	0.0445
Total error	1.54732	9	0.171925		
Total (corr.)	5.82417	14			

R-cuadrado = 73.4328%

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 58.6732%

Error estándar de estimación = 0.414638

Error absoluto de la media = 0.269548

Estadístico de Durbin-Watson = 2.8624 (P=0.9253)

De acuerdo con el cuadro 4.3 son cuatro efectos los que tienen un valor p menor a 0.1, indicando que son significativamente diferentes de cero al 90.0% de nivel de confianza

Según se observa el modelo explica el 73.4328% de la variabilidad en el Rendimiento. El R-cuadrado ajustado, es 58.6732%. El error estándar de la estimación muestra que la desviación estándar de los residuales es de 0.414638. El error absoluto medio de 0.269548 es el valor medio de los residuales. El estadístico Durbin-Watson de 2.8624 indica que, no hay indicativo de autocorrelación seria en los residuales.

El gráfico de Pareto para los efectos más importantes según el nuevo análisis se presenta en la figura 4.2

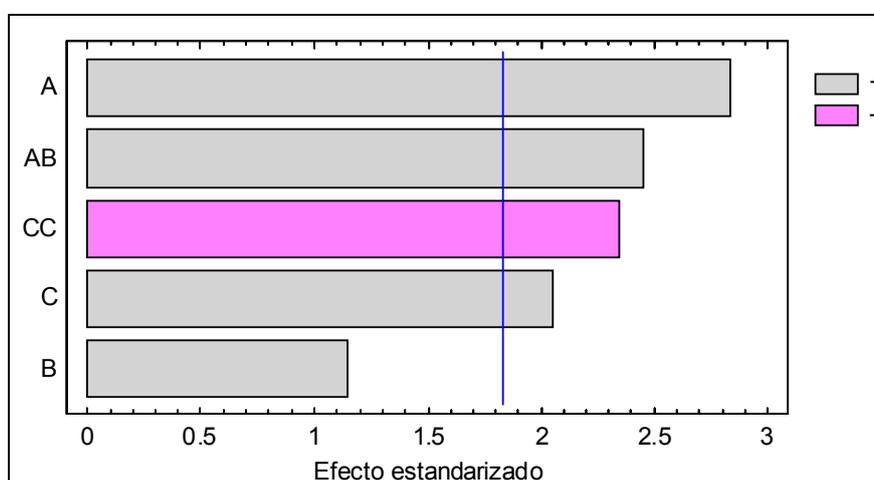


Figura 4.2 Gráfico de Pareto estandarizado para los efectos más importantes en el rendimiento de pectina, con un nivel de significancia de 10%.

Cuando los grados de libertad disponibles para estimar el error experimental son pequeños, el valor F en el cuadro ANOVA puede no tener mucho poder, y los efectos

más pequeños no parecerán ser significativos. Una manera de ver cuales efectos son reales y cuales son probablemente manifestaciones de ruido, es a través del gráfico de probabilidad normal de los efectos de la figura 4.3. En éste los efectos estandarizados están ordenados del más pequeño al más grande y graficados contra una distribución normal. En él hay un punto para cada efecto en el modelo, el propósito es que los efectos que no son reales sino manifestaciones de interferencia seguirán una distribución normal centrada en cero; y está escalado de tal forma que los efectos no auténticos caerán a lo largo de la línea recta mientras que las señales reales, caerán fuera de la línea a la izquierda o a la derecha. Es importante advertir que este tipo de gráfico asume que algunos efectos estimados son reales y otros son ruidos, al haber eliminado ya algunos factores la interpretación de este gráfico debe hacerse con cuidado.

Como puede observarse de la figura 4.3 los efectos indicados como importantes en el diagrama de Pareto, lo son también según el gráfico de probabilidad normal.

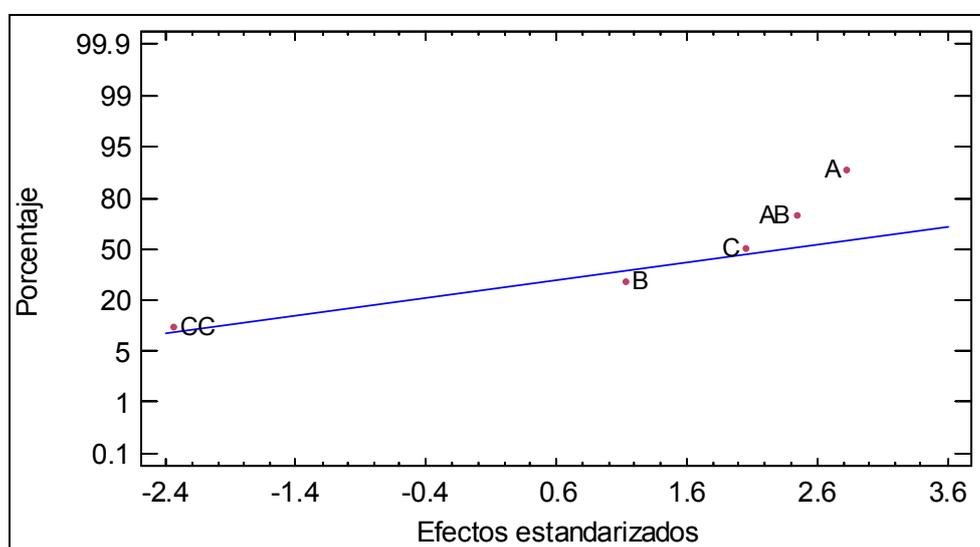


Figura 4.3 Gráfico de probabilidad normal para rendimiento de pectina

El cuadro 4.4 muestra los coeficientes de regresión estimados que se ajustan a los datos el rendimiento en función de los factores que se consideran significativos estadísticamente.

Cuadro 4.4 Coeficientes de regresión para rendimiento de pectina.

Coeficiente	Estimado
constante	13.1229
A	-0.263125
B	-5.7575
C	0.115143
AB	0.1015
CC	-0.00125179

Y la ecuación del modelo es:

$$\text{Rendimiento} = 13.1229 - 0.263125 * \text{Temperatura} - 5.7575 * \text{pH} + 0.115143 * \text{Tiempo} + 0.1015 * \text{Temperatura} * \text{pH} - 0.00125179 * \text{Tiempo}^2$$

Donde el rendimiento está en g/litro de agua miel libre de sólidos gruesos, la temperatura en °C, y el tiempo en minutos.

En la figura 4.4 de residuos versus predicciones del ajuste, cualquier patrón no aleatorio indicaría que el modelo seleccionado no describe adecuadamente los datos observados.

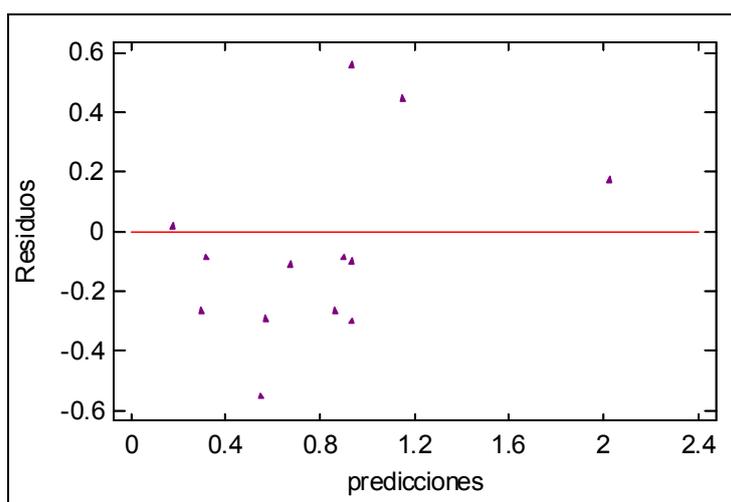


Figura 4.4 Gráfico de residuos versus predicciones para rendimiento de pectina.

Con el modelo ajustado, los resultados pueden presentarse de forma que estén sólo efectos principales, como lo muestra la figura 4.5; en ésta se observa como la respuesta predicha varía cuando cada uno de los factores del modelo cambia de su nivel bajo a su nivel alto, con todos los demás factores manteniéndose en el centro de la región experimental. Cuando todos los factores se grafican juntos es más fácil observar cual tiene el mayor impacto. Es importante mencionar que en él se grafica la respuesta predicha del modelo actual y no los datos observados.

Según éste, los rendimientos más altos se obtendrán a valores de temperatura y pH altos, el tiempo describe un comportamiento de segundo orden para la región experimental, es decir, el espacio delimitado por los rangos de experimentación utilizados en cada factor. El factor más sensible para el aumento del rendimiento es la temperatura (pendiente pronunciada), el siguiente es el pH y por último estaría el tiempo.

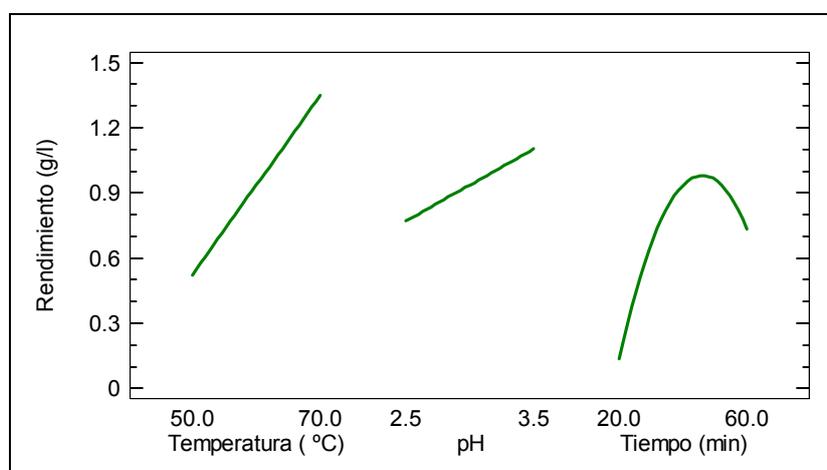


Figura 4.5 Gráfico de efectos principales para el rendimiento de pectina

Cuando existen interacciones significativas entre los factores experimentales, el gráfico de efectos principales no revela completamente cómo interactúan y puede ser incluso engañoso. En tales casos un gráfico de interacciones como el de figura 4.6 puede generarse para cada par de factores. Un par de líneas se grafica para cada interacción, correspondiente a la respuesta predicha cuando un factor se varía desde su valor bajo

hasta su valor alto, a cada nivel del otro factor. Todos los factores no incluidos en la interacción se mantienen en su valor central.

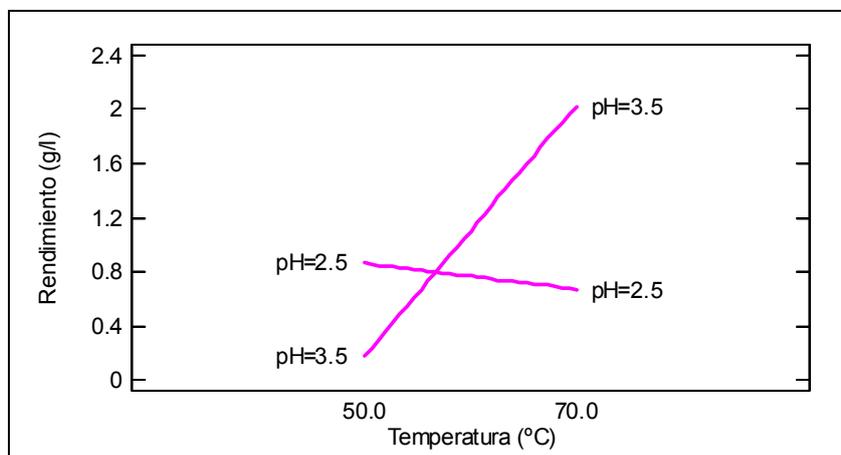


Figura 4.6 Gráfico de interacciones entre los efectos para el rendimiento de pectina

Esta figura muestra la respuesta estimada rendimiento como función del par de factores temperatura y pH que dan los valores de rendimiento más altos en la figura 4.5. En una línea, el factor pH se mantiene en su nivel bajo. En la otra, se mantiene a su nivel alto mientras los demás factores permanecen constantes en sus valores centrales.

En la figura 4.7 se muestra la respuesta estimada como función de la temperatura y el pH. La altura de la superficie representa el valor del rendimiento. Los otros factores se mantienen constantes.

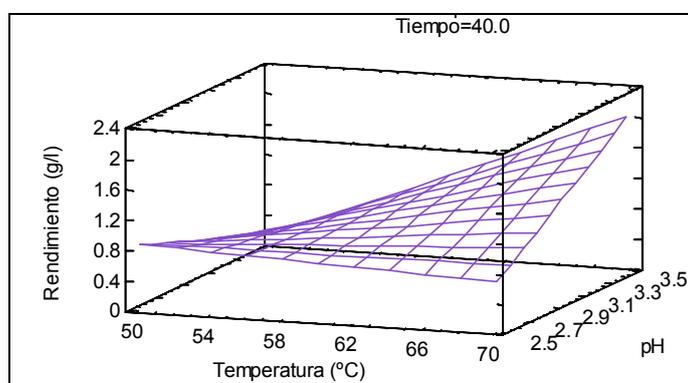


Figura 4.7 Gráfico de superficie de respuesta para tiempo=40 minutos.

La figura 4.8 muestra los contornos de la superficie mostrada en la figura 4.7 del rendimiento como función de la temperatura y pH. Cada línea de contorno representa combinaciones de temperatura y pH que da un valor seleccionado para el rendimiento, mientras el tiempo se mantiene constante en un valor de 40 minutos.

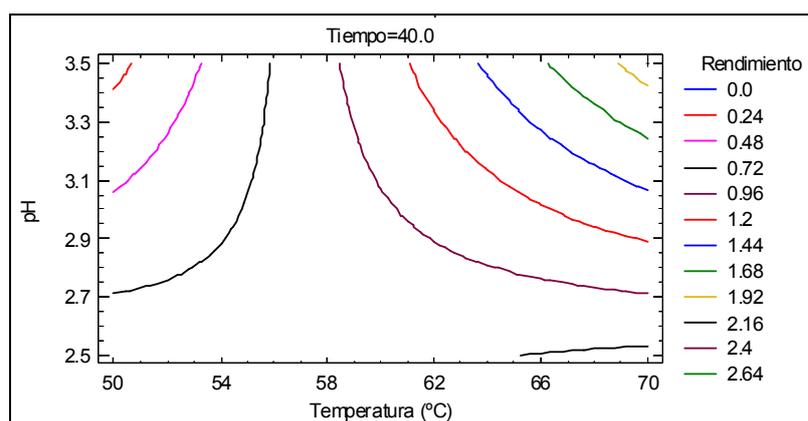


Figura 4.8 Gráfico de contornos para superficie de respuesta estimada con tiempo=40 minutos.

En la figura 4.9 la superficie de respuesta muestra el rendimiento como función de temperatura y tiempo. En la figura 4.10 cada línea de contorno representa combinaciones de estos factores que dan un valor para la variable respuesta, cuando el pH se mantiene constante en su valor medio de 3.0.

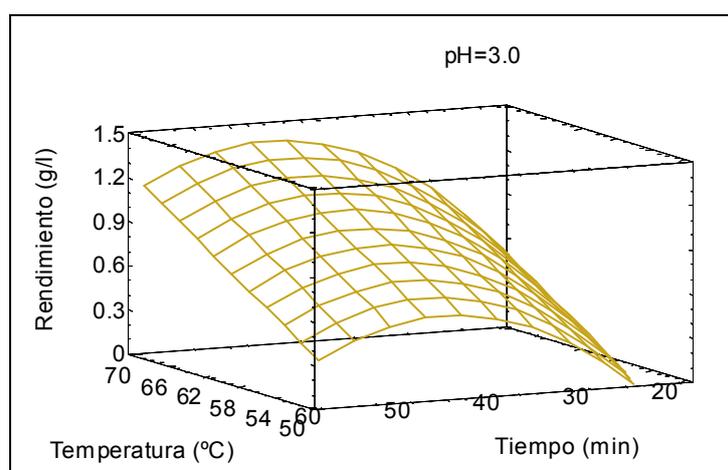


Figura 4.9 Gráfico de superficie de respuesta para pH=3.0

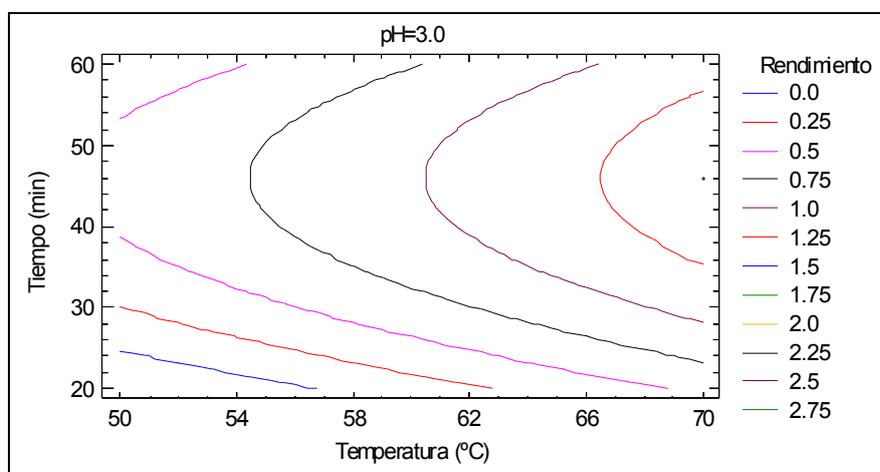


Figura 4.10 Gráfico de contornos para superficie de respuesta estimada con $pH= 3.0$

Al variar los factores tiempo y pH se obtienen las figuras 4.11 y 4.12, muestran la superficie de respuesta y gráfico de contornos respectivamente que dan el rendimiento de pectina para combinaciones de este par de factores cuando la temperatura permanece constante en $60^{\circ}C$.

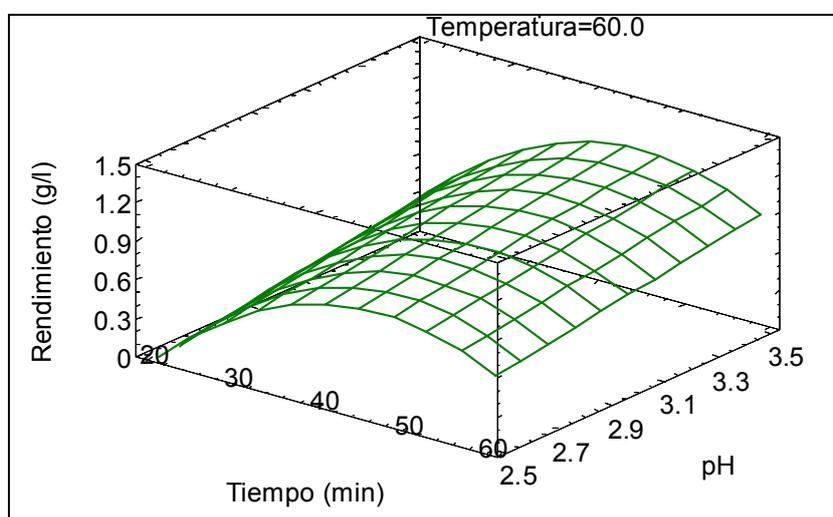


Figura 4.11 Gráfico de superficie de respuesta estimada para temperatura= $60^{\circ}C$

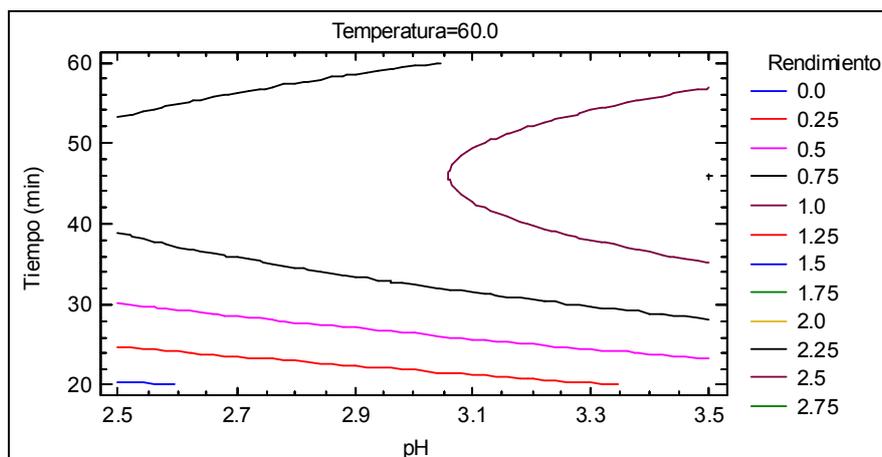


Figura 4.12 Gráfico de contornos para superficie de respuesta estimada con temperatura=60°C

Optimización de la variable respuesta

Una vez se tiene el modelo debidamente ajustado se procede a explorar la superficie descrita por el modelo para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado un valor óptimo de la respuesta, para determinar la dirección óptima de movimiento en la que se debe experimentar en el futuro. Si el modelo no explica un mínimo de 70% del comportamiento de la respuesta, en términos de R^2 ajustado, no se recomienda utilizarlo para fines de optimización del proceso (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Según el valor de R^2 ajustado para el modelo luego de eliminar los factores estadísticamente menos importantes, se tiene que el valor de la optimización de la respuesta que se obtiene será de utilidad únicamente para determinar la dirección de movimiento óptima en la que se debe experimentar en el futuro. El cuadro 4.5 muestra la combinación de niveles de factores que maximiza el rendimiento sobre la región indicada.

Objetivo: maximizar rendimiento

Valor óptimo = 2.06815 g/litro de agua miel

Cuadro 4.5 Niveles de factores para maximizar el rendimiento de pectina

Factor	Bajo	Alto	Optimo
temperatura (°C)	50.0	70.0	70.0
pH	2.5	3.5	3.5
tiempo (min)	20.0	60.0	45.9617

Al comparar los resultados experimentales obtenidos en el cuadro 3.12 de la sección 3.4 para el rendimiento se tiene que el valor experimental (observado) es de 2.2g/l de agua miel libre de sólidos gruesos y el predicho por el modelo ajustado utilizando la ecuación obtenida por regresión es 2.02321g/l ambos para las condiciones de temperatura= 70, pH= 3.5 y tiempo= 40 minutos. Al optimizar el modelo obtenido por regresión el rendimiento es 2.06815g/l y las condiciones predichas son temperatura= 70, pH= 3.5 y tiempo= 45.6 minutos, todas ellas se indican en el cuadro 4.6.

Cuadro 4.6 Niveles de factores óptimos para el rendimiento de pectina

Factor	Bajo	Alto	Optimo (Observado)	Optimo (predicho)	Optimo (Modelo)
temperatura (°C)	50.0	70.0	70	70	70.0
pH	2.5	3.5	3.5	3.5	3.5
tiempo (min)	20.0	60.0	40	40	45.9617

El cuadro 4.7 contiene información de los valores generados para el rendimiento usando la ecuación del modelo ajustado en él se incluyen los valores observado experimentalmente, los valores predichos y los límites de control superior e inferior al 90% de nivel de significancia para la variable respuesta.

Cuadro 4.7 Resultados estimados para rendimiento de pectina

Prueba	Valor Observado g/l	Valor Ajustado g/l	Limite de control inferior 90.0%	Limite de control superior 90.0%
1	0.24	0.32125	-0.144202	0.786702
2	0.84	0.935714	0.648431	1.223
3	2.2	2.02321	1.41379	2.63263
4	0.6	0.863214	0.253795	1.47263
5	1.6	1.14875	0.683298	1.6142
6	0.28	0.56875	0.103298	1.0342
7	0.64	0.935714	0.648431	1.223
8	1.5	0.935714	0.648431	1.223
9	0.57	0.675714	0.0662946	1.28513
10	0.2	0.180714	-0.428705	0.790134
11	0.02	-0.27875	-0.744202	0.186702
12	0.04	0.30125	-0.164202	0.766702
13	0.82	0.90125	0.435798	1.3667
14	0.48	-0.03125	-0.496702	0.434202
15	0.0	0.54875	0.083298	1.0142

4.2 Caracterización de la pectina.

Las pruebas de identificación resultaron positivas en todos los casos. La pectina obtenida es un polvo grueso color amarillento, inodoro, que es soluble en agua formando una solución coloidal, viscosa y opaca, insoluble en alcohol puro o diluido.

Para determinar el tipo (HM o LM) se determinó el grado de metoxilación, que se basa en el análisis cuantitativo del álcali requerido para la saponificación de un éster (ver ejemplo de cálculo en anexo 11). El contenido de ácido galacturónico es esencial para determinar la pureza de la pectina. Los resultados promedio de los análisis efectuados a la pectina se presentan en el cuadro 4.8.

Cuadro 4.8 Resultados de los análisis para pectina obtenida

Prueba	Resultado promedio
Identificación	Positiva
Grupos metoxilo	6.03%
Acido galacturónico	95.36%
Acidez (pH)	4.02
Humedad	9.9%
Solubilidad	Positiva

Con base en el porcentaje de grupos metoxilo de 6.03% la pectina extraída de las aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico correspondería a las de bajo metoxilo y su riqueza ácido galacturónico de 95.36% indica que es de alta pureza.

4.3 Determinación de la calidad de la pectina extraída

Para la determinación de la calidad de las muestras de pectina extraída, se compara las propiedades de la pectina obtenida con las especificaciones de calidad de la FAO y USP (anexo 8) para pectina comercial, ver cuadro 4.9

Cuadro 4.9 Comparación de resultados de pruebas de calidad para pectina con especificaciones FAO y USP.

Prueba	Especificación FAO	Especificación USP	Pectina obtenida en promedio	Pectina comercial
Identificación	----	----	Positiva	----
Grupos metoxilo	----	Min 6.7%	6.03%	4.2 – 10.5 %
Acido galacturónico	Min 65%	Min 74%	95.36%	> 65% (típicamente 75-80%)
Acidez (pH)	----	----	4.02	3.8
Humedad	Max 12%	Max 10%	9.9%	----
Solubilidad	----	----	Positiva	----

---- = ninguna especificación

La pectina no debe tener menos del 6.7% de grupos metoxilos, ni menos de 74% de ácido galacturónico, según USP. Se observa que la pectina obtenida está dentro de los rangos establecidos en contenido de ácido galacturónico, humedad y un poco por debajo para los grupos metoxilos. Para los rangos tabulados por la FAO se tiene que la pectina extraída está dentro del intervalo para la riqueza en ácido galacturónico y la humedad, las otras características de pH, solubilidad no tienen especificación establecida.

Uno de los efectos del tratamiento de la hidrólisis ácida, conocidos es la remoción de los grupos éster, reacción que procede lento en frío pero a temperaturas altas más de 50°C hay demetilación progresiva a mayor velocidad. Esto puede haber ocurrido para que el contenido de grupos metoxilos haya sido bajo, además se debe recordar que se ha extraído a partir de aguas mieles congeladas en las cuales como se observa en el cuadro 3.5 y 3.6 difiere el rendimiento para las mismas condiciones de extracción cuando se trabaja con muestras frescas.

Las variaciones en el grado de metilación se pueden atribuir a factores como los diferentes contenidos de grupos metoxilo de las sustancias pécticas en su estado natural, durante la extracción y purificación de la pectina puede haber cambios significativos en el porcentaje por los tratamientos a los que se somete; además pueden existir cambios durante el almacenamiento ya que las soluciones de ácidos pécticos y pectínicos se degradan con el tiempo y considerando que la muestra es una suspensión.

La pectina en polvo con menos de 10% de humedad experimenta pequeños cambios durante largos periodos de almacenamiento a temperatura ambiente y la pectina obtenida con 9.9% está dentro de este rango.

4.4 Efectos ambientales en el proceso de extracción de pectina

La fabricación de pectinas incrementa el valor de los desechos de la industria de producción de jugos pero su proceso de manufactura tradicional demanda considerables cantidades de agua y sus efluentes contienen materiales indeseables, tales como carbohidratos solubles y ácidos neutralizados. Estas fábricas tratan los efluentes del proceso en sus propias plantas para aguas residuales y el alcohol se recupera para utilizarlo en el proceso.

En la actualidad, el grupo corporativo Herbstreith & Fox es uno de los mayores productores de pectina a nivel mundial. Con décadas de investigación y desarrollo en la industrialización de pectinas, han encontrado usos para los residuos del proceso de extracción de pectina:

Después de ser destilado el etanol usado para la precipitación, regresa al ciclo de la precipitación. Los azúcares, ácidos, pigmentos naturales aún permanecen en el líquido residual. En etapas de procesamiento adicional, se usan tecnologías especiales para remover los pigmentos naturales, sustancias minerales y los ácidos frutales de sus extractos.

Puede obtenerse un producto conteniendo únicamente los azúcares de la respectiva materia prima que se ha procesado y son usados en la industria alimenticia como agentes endulzantes. Otra alternativa es su fermentación para producir alcohol. Los residuos sólidos de la materia prima, libres de pectina se secan y comprimen en pellets. Debido a su contenido energético y alto valor nutritivo, esos residuos tienen demanda como forraje para ganado.

En el caso de utilizar las aguas miles del café para producción de pectinas ya que no se parte de material sólido sino de una suspensión que tiene aproximadamente 97% agua, la demanda de ésta no sería tan alta. El etanol se recuperaría por destilación para reutilizarlo. En cuanto al líquido remanente rico en azúcares y ácidos podrían realizarse investigaciones orientadas al aprovechamiento de éste para determinar si es posible su

utilización como en el caso de los residuos de la industria que procesan pectinas a partir de otros residuos agrícolas.

La cantidad de aguas mieles producidas en determinado beneficio depende de la tecnología aplicada, su capacidad de procesamiento y de la recepción de café para la temporada. En El Salvador se cuenta con beneficios que producen entre 5,000 qq y 275,000 qq de café oro por temporada, generando aproximadamente de 5,000 litros a 275,000 litros de aguas mieles si se procesara por desmucilaginado mecánico. En el caso de un beneficio que produce 98,000 qq oro y que cuente con desmucilaginator mecánico, produciría aproximadamente 98,000 litros de agua miel solo para esta etapa el procesamiento. Con el rendimiento máximo obtenido experimentalmente de 2.2 g/litro de agua miel, se estima una capacidad de extracción de 215.6 kg de pectina en polvo.

5.0 CONCLUSIONES.

- 1) Para la conservación de las aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico libres de sólidos gruesos se propusieron tres tratamientos, de los cuales el más adecuado fue el congelamiento, por presentar mayor estabilidad de la muestra en el transcurso del tiempo, y poco cambio en el rendimiento respecto de la misma muestra fresca, además de presentar la ventaja de que al no utilizar alta temperatura previene la remoción de los grupos éster.
- 2) La pectina extraída de las aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico de la variedad Bourbón por el método empleado es de bajo metoxilo, de alto contenido en ácido poligalacturónico (95.39%), soluble en agua, con humedad del 9.9% y pH= 4.02.
- 3) El mayor valor de rendimiento de pectina fué 2.2 g/litro de agua miel libre de sólidos gruesos, se obtuvo bajo las condiciones: temperatura = 70°C, pH = 3.5 y tiempo = 40 minutos tanto en los ensayos experimentales como en las predicciones del modelo ajustado a partir del análisis estadístico. La optimización del rendimiento se obtuvo bajo las condiciones: temperatura = 70°C, pH = 3.5 y tiempo = 46 minutos.
- 4) De las tres variables de investigación, temperatura, pH y tiempo de extracción se determinó que el orden de influencia en cuanto a efectos sobre el rendimiento es en orden siguiente: temperatura, pH y tiempo.
- 5) Al considerar efectos totales tanto individuales y combinados, del análisis estadístico se observa que la combinación de los factores pH-temperatura presenta un cambio más marcado en el rendimiento de pectina.
- 6) Los valores óptimos de los factores para el rendimiento de pectina de aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico, señalados en este

documento pueden utilizarse para orientar investigaciones futuras; y no constituyen condiciones de proceso.

- 7) Los parámetros de calidad de la pectina obtenida se encuentran dentro de los requerimientos establecidos de la FAO. Según los rangos de la USP cumple, excepto para el mínimo de grupos metoxilos.
- 8) Las aguas mieles del beneficiado de café procedentes de desmucilaginado mecánico constituyen una fuente de sustancias pécticas, éstas podrían procesarse para extraer pectinas de bajo metoxilo, las cuales tienen aplicaciones en la industria.

6.0 RECOMENDACIONES

- 1) Realizar investigaciones que incluyan aguas mieles procedentes de diferentes zonas del país, se sabe que en el contenido de sustancias pécticas influye las condiciones de cultivo, estado de madurez del fruto, y altitud.
- 2) Evaluar otras propiedades importantes de la pectina que no se pudieron determinar por falta de recursos en el presente trabajo, como lo son el peso molecular, contenido de azúcares, análisis microbiológicos para determinar características deseables en la pectina del café.
- 3) Realizar estudios de obtención de pectina utilizando el método de extracción con agentes quelantes y evaluar las características químicas y físicas del producto a obtener.

7.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anger, H., and Berth, G. (1986). Gel permeation chromatography and the Mark-Houwink relation for pectins with different degrees of esterification. *Carbohydrate Polymers*, N°6, p.193-202.
2. Aspinall, G.O. (1982). Analysis of polysaccharides. En: *Food Carbohydrates*. Lineback, D.R. y Inglett, G.E. Ed. AVI Publishing Company, Inc: Westport Connecticut. p.356-374
3. Axelos, M.A.V. y Thibault, J.F. (1991). The Chemistry and Technology of Pectin. Ed. Academic Press. New York. p. 206
4. Beneficio de café "Cooperativa Cuzcachapa de R.L." (2007). Visita de campo
5. BeMiller, J.N. (1986). An Introduction to pectins: Structure and Properties. En *Chemistry and Function of Pectins*. Fishman, M.L. y Jen, J.J. Ed. American Chemical Society Symposium Series N° 310, Washington D.C. p.1-10
6. Calle, H. (1977) Subproductos del café. Centro Nacional de Investigaciones de Cafe, *CENICAFÉ*. Boletín N° 6, p. 84 Colombia.
7. Calle, H. (1979) Subproductos del café. Asociación Nacional del café, *ANACAFE*, Vol 5, N° 193 p. 15 Guatemala.
8. Canteri-Schemin, M.H.; Ramos Fertoni, H.C.; Waszczynskyj, N.; y Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48, p.259-266

9. Constenla, D. y Lozano, J. E. (2003). Kinetic model of pectin demethylation. *Latin American applied Research*, 4, p.91-96.
10. D'Addosio, R.; Páez, G.; Marín, M.; Mármol, Z., y Ferrer, J. (2005). Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener), Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela
11. Daniels, F.; Williams, J.W.; Bender, P.; Alberty, R.A.; Cornwell, C.D. y Harriman, J.E. (1970). Experimental Physical Chemistry, 7ª Ed. Mc Graw-Hill, New York.
12. De Vries, J. A.; Den Uijl, C. H.; Voragen, A. G. J.; Rombouts, F. M. y Pilnik, W. (1983). Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, N°1 p.193-205.
13. De Vries, R. P. y Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* N°65, p.497-522
14. Fishman, M. L. (1986). Chemistry and Function of Pectins. ACS Symposium Series, p. 22
15. Flores, M.J. (1979). Fundamentos botánicos y fisiológicos del cultivo del café y su relación en la productividad de una finca. En: "Curso de técnicas modernas para el cultivo del café". Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café (ISIC). p. 1-13.
16. Fogarty, W.M. y Kelly, C.T. (1983). Pectic enzymes. En: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. W. Fogarty. Ed. Applied Science Publishers. New York. p.131-182.

17. Garna, H.; Mabon, N.; Robert, C.; Cornet, C.; Nott, K.; Legros, H.; Whathelet, B. ; y Paquot, M. (2007). Effect of Extraction Conditions on the Yield and Purity of Apple Pomace Pectin Precipitated but Not Washed by Alcohol. *Food Chemistry and Toxicology* N°72, p.1-9
18. Grassin, C. y Fauquembergue, P. (1996). Application of pectinases. En: *Pectins and Pectinases*. J.Visser and A.G.J. Voragen Ed. Elsevier Science B.V.: The Netherlands. p. 453-462.
19. Gutiérrez, H. y De la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. 2º ed. Mc. Graw Hill. México.
20. Heredia, A.; Jiménez, A. y Guillen, R. (1995). Composition of plant cell wall. *Zeitschrift fur lebensmittel-untersuchung und-forschung* N° 200, p.24-31.
21. Iglesias, M.T. y Lozano, J.E. (2004). Extraction and characterization of sunflower pectin, *Journal of food engineering*, 62, p. 215-223.
22. Kravtchenko T. P.; Voragen A. G. J. y Pilnik W. (1992). Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydrate Polymers* N°18, p.17-25.
23. Kertesz, Z.I. (1951). The pectic substances. New York. Interscience.
24. Lardé, G.; Velázquez, E.; Rodríguez, N.; Hernández, O.; Jacinto, S.; Ortíz, E. y Zelaya, W. (1997). Situación actual de los desechos líquidos del café en El Salvador. En: “*Simposio Latinoamericano de Caficultura*”. Memorias. San José, Costa Rica, ICAFE/IICA-PROMECAFE. p. 425-428.
25. Larde, G., (1998). Situación Tecnológica y ambiental del beneficiado del café en El Salvador. En *Seminario Regional de consulta sobre la situación actual del beneficiado de café*. Memorias CICAPE.

26. May, C.D. (1990). Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* N°12 p.79-99.
27. Menchú, J.F. (1973). Manual Práctico de beneficios de café. Asociación Nacional del Café (ANACAFE). Boletín No. 13, Guatemala.
28. Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Barton, D.; Nakanishi, K. y Meth-Cohn, O. Ed. Elsevier: Amsterdam. p. 497-527.
29. Ministerio de Economía. Resumen de estadísticas 2000 - 2006. El Salvador
30. Nakamura, T.; Hours, R.A. y Sakai, T. (1995). Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, N°60 p. 468-472.
31. O'Neill M. A.; Ishii T.; Albersheim P. y Darvill A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, N°55, p.109-139.
32. Perez, S. ; Mazeau, K. y Du Penhoat, C. H. (2000). The three dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry* N°38, p.37-55.
33. Pilgrim, G. W.; Walter, R. H. y Oakenfull, D. G. (1991). Jams, jellies, and preserves. En *Chemistry and technology of pectins*. Walter, R. H. California. Ed. Academic Press, Inc., p. 23–50.
34. Pilnik, W. y Romboust, F.M. (1979). Utilization of pectic enzymes in food production. En: *Food Science and Technology*. Chiba, H.; Fujimaki, M.; Iwai, K.; Mitsuda, H. y Morita, Y. Ed. Elsevier Amsterdam, p.269-277.

35. Pilnik, W. y Voragen, A.G.J. (1970). Pectic substances and other uronides. En *The biochemistry of fruits and their products*. Humle, A.C., Academic Press, Londres. Vol. 1 p. 53-87,
36. Porres, C, Franco M. (2000). Guía de prevención de la contaminación para el beneficiado de café en El Salvador. USAID/Proyecto de Prevención de la Contaminación Ambiental (EP3). Hagler Bailly Inc.
37. PROCAFE, Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (2003). Manual del caficultor Santa Tecla. El Salvador
38. PROCAFE, Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café y CSC Consejo Salvadoreño del Café (2005). Boletín Estadístico de la caficultura. Santa Tecla. El Salvador.
39. PROCAFE, Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (2005). Programa Integral de Renovación del Parque Cafetalero. Santa Tecla. El Salvador.
40. PROCAFE, Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (2006). Manual del caficultor Tomo I y II. Santa Tecla. El Salvador.
41. Rees, D. A.; Morris, E. R.; Thom, D. y Madden, J. K. (1982). Shapes and interactions of carbohydrate chains. En *Polysaccharides*. Aspinall, G. O. Ed.. Nueva York: Academic Press, p. 195-290.
42. Ridley, B.L.; O'Neill, M.A.; Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and Oligogalacturonide - related signaling, *Phytochemistry*, N°57, p. 929-967

43. Rodríguez, N. (2000). Manejo de residuos en la agroindustria cafetalera. Seminario Internacional Gestión Integral de residuos sólidos y peligrosos, siglo XXI.
44. Rolin, C.; Nielsen, B.U. y Glahn, P.E. (1998). Pectin. En: *Polisaccharides. Structural diversity and function versatility.* S. Dumitriu Ed. Mercel Dekker New York. p: 377-431.
45. Rombouts, F.M. y Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes. En: *Economic Microbiology. Microbial Enzymes and Conversions.* N°5. A.H. Rose Ed. Academic Press. New York. p.227-282.
46. Serrano, J. E. (1983). "Alternativas del Procesamiento en el Desarrollo de Agro-Industrias en El Salvador". Trabajo de Graduación para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad de El Salvador.
47. Thakur, B.R.; Singh, R.K.; Handa, A.V.(1997). Chemistry and uses of pectin. A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.37, N°1, p.47-73
48. The United States Pharmacopeia (1995) p.1161-1162
49. Thibault, J.F.; Ralet, M. C. (2003). Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction. En *Advances in Pectin and pectinase Research.* Voragen A. G. J., Schols H. A., Visser, R.G.F. Kluwer Academic Publishers, Netherlands p. 95
50. Van Buren, J.P. (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness. En: *The Chemistry and Technology of Pectin.* Walter, R.H. Academic Press, Inc. San Diego p. 1-22.

51. Vásquez, R (1996). El Manejo de efluentes en el beneficiado de café en Costa Rica. En: *X Congreso Nacional Agronómico de Recursos Naturales*, Instituto del Café. San José Costa Rica.
52. Vincken J.P., Schols H. A., Oomen R. J. F. J., Beldman, G., Visser, R.G.F., Voragen A. G. J., (2003). Pectin. The Hairy thing. En *Advances in Pectin and pectinase Research*. Voragen A. G. J., Schols H. A., Visser, R.G.F. Kluwer Academic Publishers, Netherlands p. 47-57
53. Voragen A. G. J.; Pilnik W.; Thibault J.F.; Axelos M. A. V.; Renard C. M. G. C., (1995). Pectins. En: *Food polysaccharides and their applications*; Stephen A. M., New York: Marcel Dekker Inc, p. 287-339.
54. Vlugt-Bergmans, C.J.B.; Meeuwsen, P.J.A.; Voragen, A.G.J. y van Ooyen, A.J.J. (2003). Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. En *Advances in Pectin and pectinase Research*. Voragen A. G. J., Schols H. A., Visser, R.G.F. Kluwer Academic Publishers, Netherlands p. 257
55. Wang, Q.; Pagan, J.; Shi, J. (2002). Pectin from fruits. [S.I.]: CRC, p. 1-47.
56. Willats, W.G.; Knox, J.P.; Mikkelsen, D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel *Food Science & Technology* N°17, p. 97–104
57. Yapo, B. M.; Robert, C.; Etienne, I.; Wathelet, B. Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity, and surface properties of sugar beet pulpa pectin extracts. *Food Chemistry*, 100, p.1356-1364.

Referencias en Internet:

Banco Multisectorial de inversiones (BMI) Fecha de consulta: marzo 2008

http://www.bmi.gob.sv/portal/page?_pageid=38,90971&_dad=portal&_schema=PORTAL

Consejo Salvadoreño del Café Fecha de consulta: febrero 2008

<http://www.consejocafe.org.sv/estadisticas.html>

Restrepo, J. R. "Caracterización física y química de los frutos de café" Fecha de consulta: febrero 2008

<http://www.cedeco.or.cr/documentos/Caracterizacion%20del%20cafe.pdf>

Cybercolloids Fecha de consulta: marzo 2008

www.cybercolloids.net/

Herbstreith & Fox Fecha de consulta: marzo 2008

<http://www.herbstreith-fox.de/>

IHCAFE Fecha de consulta: febrero 2008

<http://www.cafedehonduras.org/ihcafe/>

International Pectin Producers Association. "Specification for Pectins." Fecha de consulta: marzo 2008

http://www.ippa.info/specification_for_pectins.htm

Monografías.com Fecha de consulta: febrero 2008

<http://www.monografias.com/trabajos43/pulpa-de-cafe/pulpa-de-cafe.shtml>

NSO 13.49.01:06 "Agua. Aguas residuales descargadas un cuerpo receptor". Fecha de consulta: abril 2008

http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/slv81_t.pdf

Organización internacional del café. Fecha de consulta: febrero 2008

<http://www.ico.org>

Rodríguez, N "Manejo de residuos en industria cafetalera". Fecha de consulta: marzo 2008

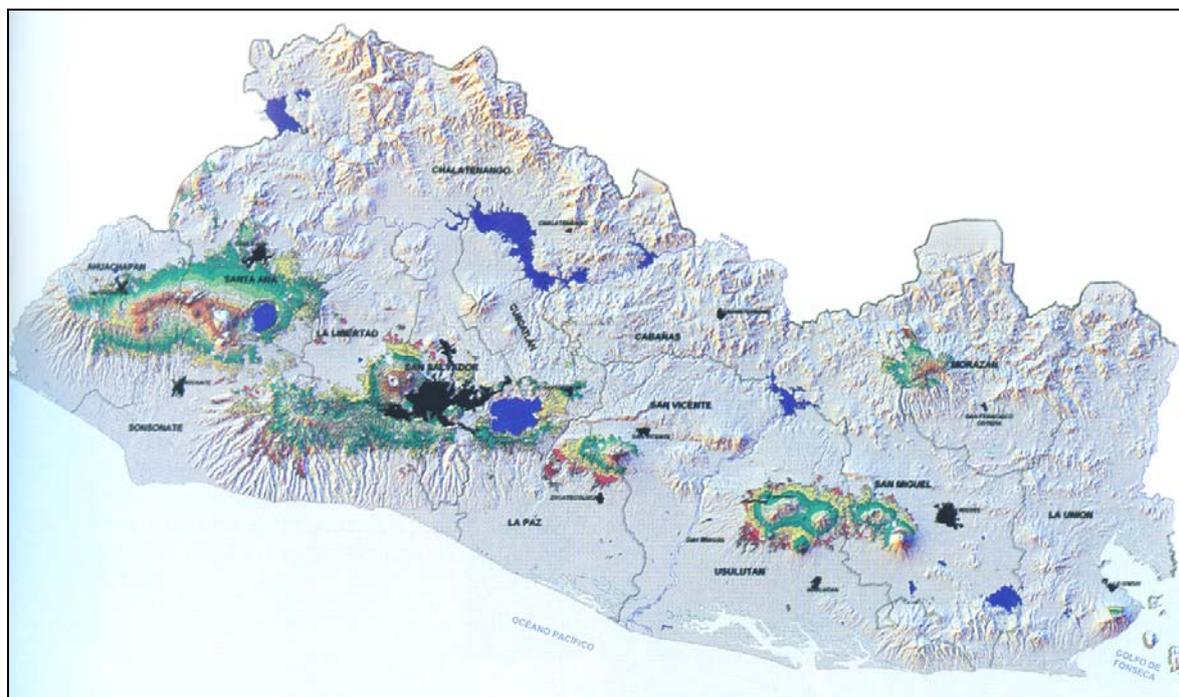
<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxx.pdf>

Sriamornsak, P. "Chemestry of pectin and its pharmaceutical uses: a review". Fecha de consulta: marzo 2008

www.journal.su.ac.th/index.php/suij/article/view/48

ANEXOS

Anexo 1 Cadenas montañosas, departamentos, altitudes y área de producción de café.

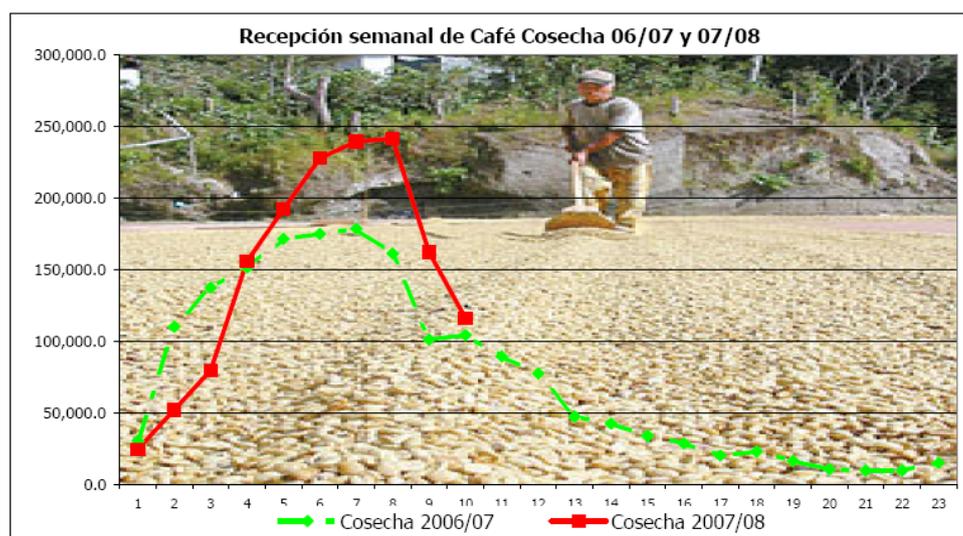


Anexo 2 Recepción semanal de café en El Salvador cosechas 2006/07 y 2007/08.

Cosecha 2006/07		Variación %	Cosecha 2007/08	
Período	qq-oro-uva		qq-oro-uva	Período
Octubre/2006	30,137.30	-19%	24,276.20	Octubre/2007
Del 01-nov-06 al 12-nov-06	109,885.60	-53%	51,789.75	Del 01-nov-07 al 11-nov-07
Del 13-nov-06 al 19-nov-06	137,065.00	-42%	79,480.65	Del 12-nov-07 al 18-nov-07
Del 20-nov-06 al 26-nov-06	151,222.80	3%	155,519.00	Del 19-nov-07 al 25-nov-07
Del 27-nov-06 al 03-dic-06	171,141.60	12%	191,826.04	Del 26-nov-07 al 02-dic-07
Del 04-dic-06 al 10-dic-06	174,764.20	30%	227,436.98	Del 03-dic-07 al 09-dic-07
Del 11-dic-06 al 17-dic-06	178,259.50	34%	239,233.80	Del 10-dic-07 al 16-dic-07
Del 18-dic-06 al 24-dic-06	160,999.60	50%	241,241.00	Del 17-dic-07 al 23-dic-07
Del 25-dic-06 al 31-dic-06	100,968.40	60%	161,841.60	Del 24-dic-07 al 30-dic-07
Del 01-ene-07 al 07-ene-07	104,049.80	11%	115,802.40	Del 31-dic-07 al 06-ene-08
Del 08-ene-07 al 14-ene-07	89,176.00			
Del 15-ene-07 al 21-ene-07	77,326.70			
Del 22-ene-07 al 28-ene-07	47,173.70			
Del 29-ene-07 al 04-feb-07	42,358.80			
Del 05-feb-07 al 11-feb-07	33,784.20			
Del 12-feb-07 al 18-feb-07	28,372.20			
Del 19-feb-07 al 26-feb-07	19,984.10			
Del 27-feb-07 al 04-mar-07	22,748.10			
Del 05-mar-07 al 11-mar-07	16,281.60			
Del 12-mar-07 al 18-mar-07	10,310.20			
Del 19-mar-07 al 31-mar-07	9,597.70			
Del 01-abr-07 al 30-abr-07	9,578.80			
Mayo y Siguientes	14,840.00			
Recepción acumulada	1,318,493.8	12.9%	1,488,447.4	
Total	1,740,025.9			

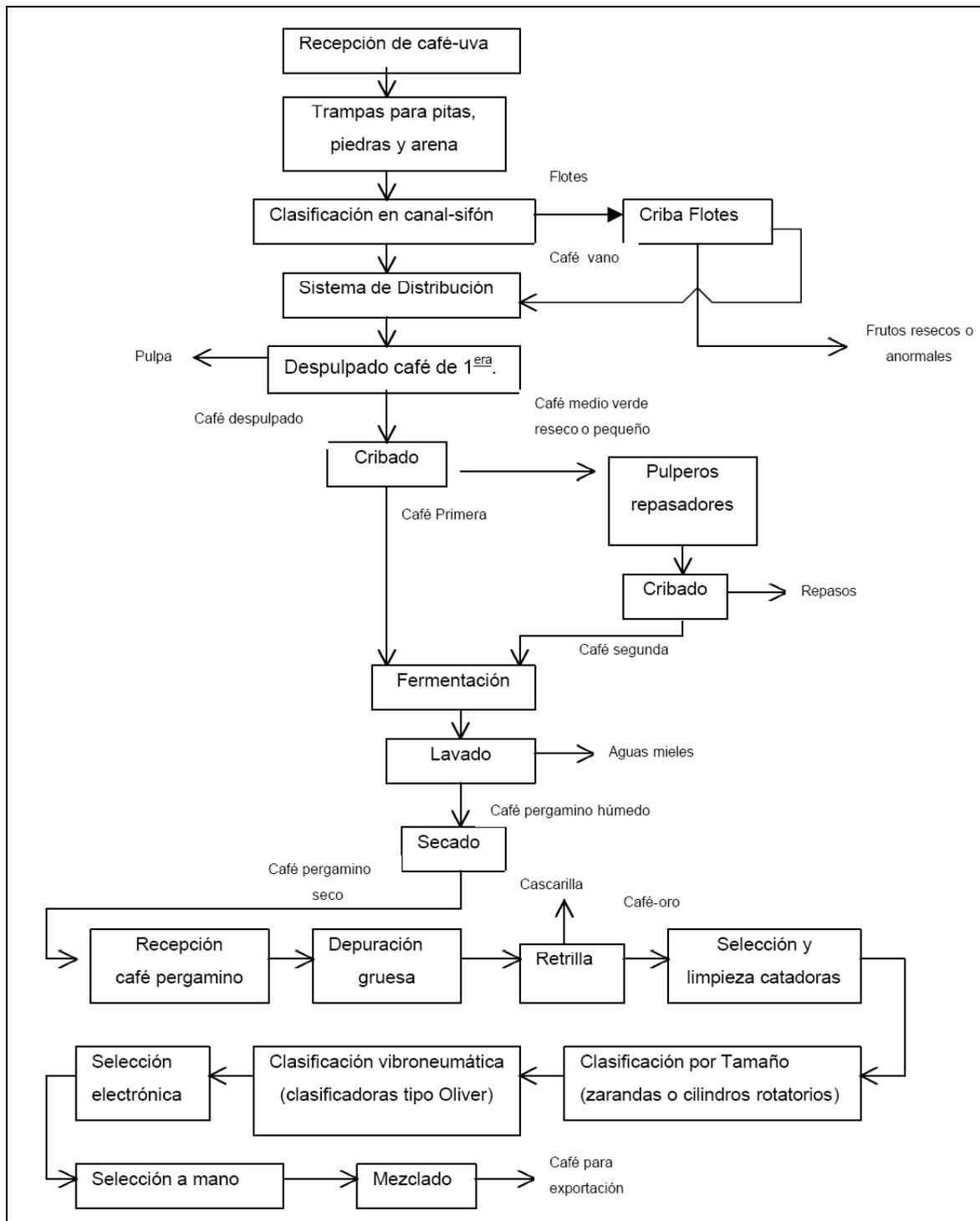
*Cifras preliminares. Beneficiadores pendientes de informar.

Cifras actualizadas 31 de agosto de 2007



FUENTE: CSC Departamento de estudios económicos y estadísticas cafetaleras

Anexo 3 Diagrama general del procesamiento de café en El Salvador



Anexo 4 Normativa medioambiental para la descarga de desechos a un cuerpo receptor en El Salvador.

Cuadro A.4.1 Valores máximos de parámetros de aguas residuales de tipo ordinario, para descargar a un cuerpo receptor.

ACTIVIDAD	DQO (mg/l)	DBO₅ (mg/l)	Sólidos Sedimentables (mg/l)	Sólidos Suspendidos Totales (mg/l)	Aceites y grasas (mg/l)
Aguas residuales de tipo ordinario	150	60	1	60	20

Fuente: CONACYT (2006)

Cuadro A.4.2 Valores máximos permisibles de parámetros para verter aguas residuales de tipo especial al cuerpo receptor por tipo de actividad.

ACTIVIDAD	DQO (mg/l)	DBO₅ (mg/l)	Sólidos sedimentables (mg/l)	Sólidos Suspendidos totales (mg/l)	Aceites y grasas (mg/l)
Productos del reino vegetal					
Beneficiado de café	2500 ²⁾	2000 ²⁾	40	1000	30

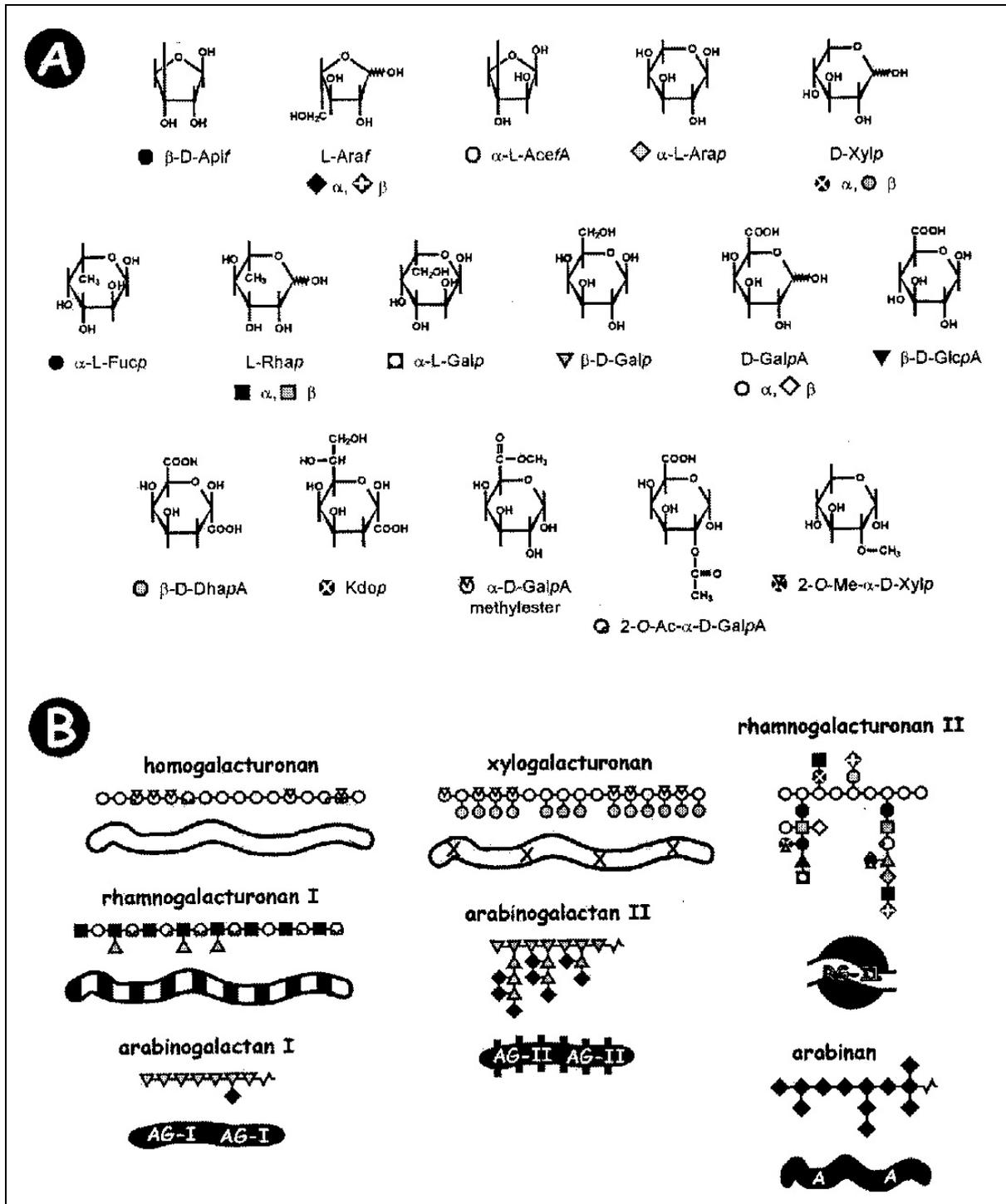
Fuente: CONACYT (2006)

²⁾ Siempre y cuando el cuerpo receptor lo permita.

NSO 13.49.01:06 "AGUA. AGUAS RESIDUALES DESCARGADAS UN CUERPO RECEPTOR".

FUENTE http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/slv81_t.pdf

Anexo 5 Estructuras esquemáticas de las pectina.



- A) resumen de la estructura de los polisacáridos pécticos
- B) estructuras esquemáticas de los constituyentes polisacáridos de pectina

Anexo 6 Material y equipo utilizado en procedimiento experimental

CRISTALERIA

Probetas de: 10, 100, 250, 500, 1000 ml

Beakers de: 50, 100, 500, 1000, 4000ml

Erlenmeyers: 250, 500, 1000, 2000 ml

Frascos volumétricos de: 250, 500, 1000 ml

Pipetas Graduadas: 1, 5, 10 ml

Pipeta volumétrica de 25 ml

Vidrios de reloj

Mortero y pistilo

Gotero

Termómetro escala °C (0-100°C)

Embudo de vidrio punta corta

Bureta de 25 ml

Cápsula de porcelana grande

Varilla o agitador de vidrio

Tubos de ensayo

Balón de fondo plano de 1000 ml

Bandeja pyrex

Cajas petri estériles

Desecador de vidrio Pyrex

MATERIAL

Gradilla para tubos de ensayo

Espátulas

Pinzas para crisol

Pinzas para tubo de ensayo

Pinzas para bureta

Soporte universal

Frasco Lavador

Pera o bomba de succión manual

Pica hielo

Tapón de hule

EQUIPO

Equipo de filtración de vacío (embudo Buchner, kitazato, tubo de extracción, bomba de vacío)

Balanza analítica

Balanza semianalitica

pH metro

Horno de vacío o estufa

Hot plate con agitador magnético

Refractómetro manual (Brixómetro)

Centrífuga con sus tubos

Refrigeradora

Freezer

Autoclave

OTROS MATERIALES

Papel filtro Whatman N°41

Plástico adhesivo para alimentos

Frascos de vidrio con rosca para guardar el producto.

Manta gruesa color blanco

Manta fina color blanco

Colador grande

Embudo plástico

Recipientes plásticos de diferentes tamaños

REACTIVOS Y SOLVENTES

HCl concentrado

NaOH en perlas

Alcohol etílico 90°

Fenolftaleína

Rojo de metilo

Biftalato de potasio

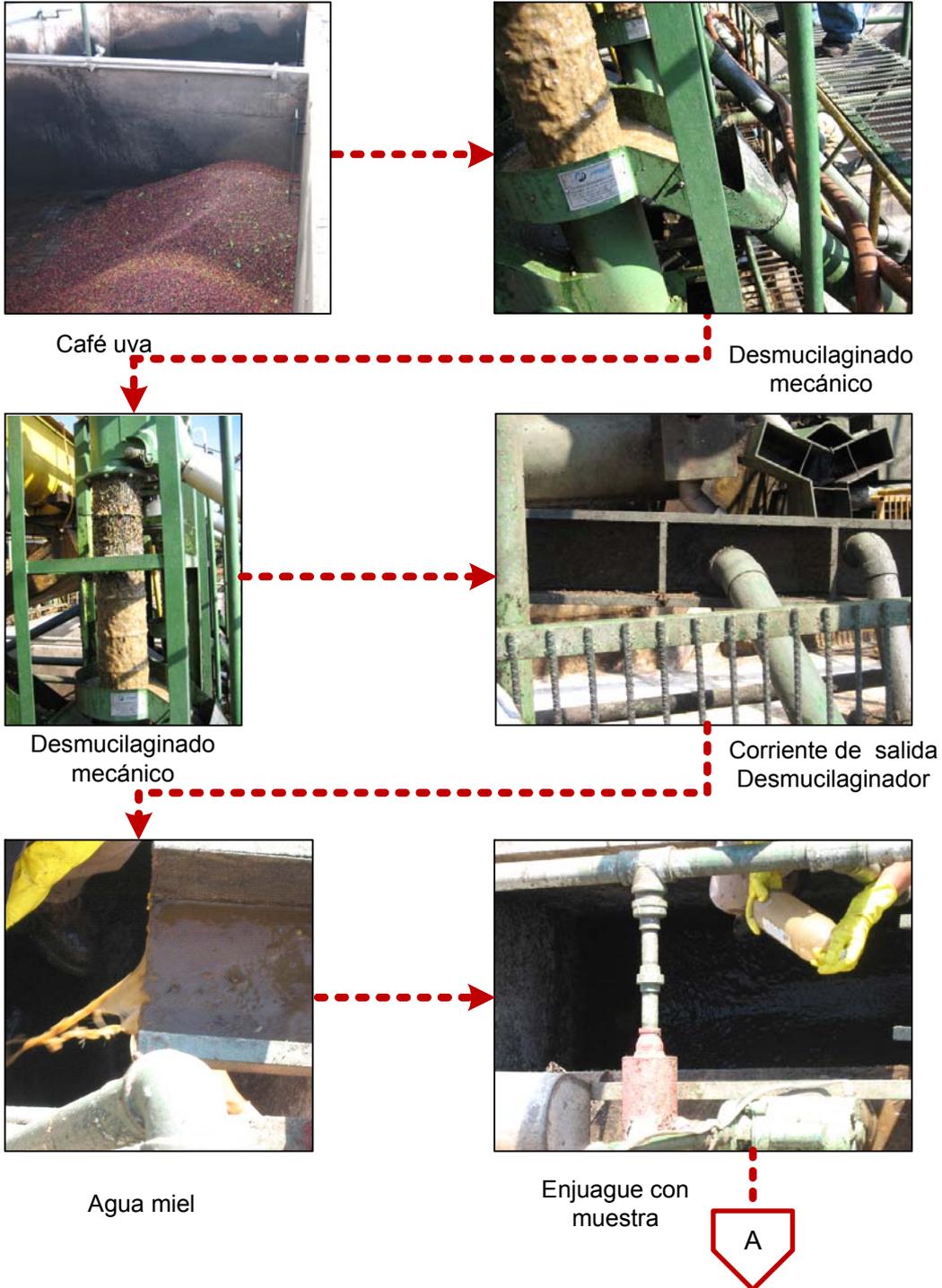
Carbonato de sodio

Agua destilada

Agua libre de CO₂ (prepararla al momento de ocupar)

Anexo 7 Proceso ilustrado de la selección y recolección de aguas mieles procedentes de desmucilaginado mecánico

Selección y recolección de la muestra



A



Recolección de muestra en
envase PET



Mantener recipiente en
hielo

Anexo 8 Procedimiento ilustrado de extracción de pectina a partir de aguas mieles procedentes del desmucilaginado mecánico

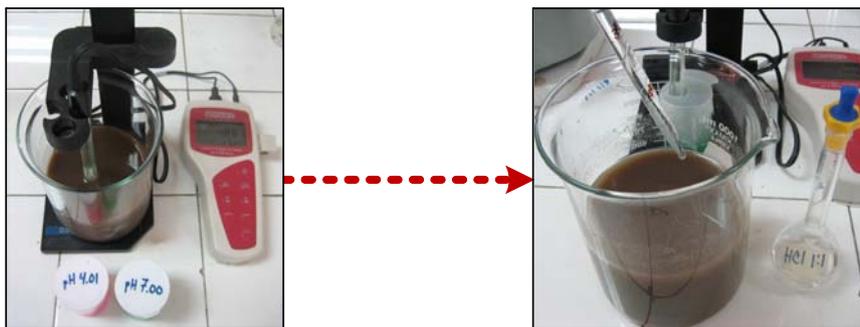
Características de la muestra



Medir 500 ml de agua miel

Pesar probeta con muestra

Hidrólisis en solución acuosa caliente en medio ácido



Medir pH de agua miel

Acidificar con HCl



Llevar a pHi

Calentar a Ti por ti min y agitar



B



Enfriar a 35°C



Subir a pH = 4
con NaOH



pH=4

Separación de mucílago



1ª Filtración con manta gruesa



Hacer presión manual



Separación de solidos en manta gruesa



Equipo de filtración al vacío



2ª Filtración con manta fina y bomba de vacío



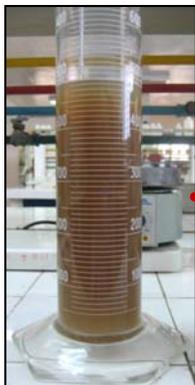


3ª Filtración con papel
Whatman 41 y bomba de vacío



Extracto péctico luego de 7
filtraciones

Precipitación de pectina con etanol



Medición de volumen de filtrado



Medir igual volumen de etanol



Mezclar y agitar por 5 min



Esperar a que sedimente



Centrifugar para separar sólidos finos

D

D



Separación de últimos sólidos finos



homogenizar la solución



Dejar en reposo de 4 a 48 horas hasta que un coágulo aparezca



Centrifugar para separar coágulo de pectina



Coágulo de pectina

Re-precipitación de pectina



Agregar etanol al 90% al líquido remanente y verificar si precipita mas pectina.



Separar el nuevo gel de la solución, unir ambos geles

Purificación de la pectina



Lavar 2 veces con etanol al 60% y filtrar con bomba de vacío usando una manta fina

Secado de la pectina purificada



Extender el gel en capas delgadas en superficie antiadherente



Secar en horno con ventilación por tres horas



Dejar enfriar



Pesar



Raspar con una espátula



Guardar en frasco limpio y seco, tapar herméticamente

Anexo 9 Regulación de requerimientos de pureza de la pectina

ESPECIFICACION INTERNACIONAL		U E E440(i) pectina	U E E440(ii) pectina amidada	FAO/WHO JECFA Pectina	FDA/FCC Pectina	USP Pectina	
1.	Pérdida de secado	max 12%	max 12%	max 12%	max 12%	max 10%	
2.	Ceniza insoluble en ácido (3 N HCl)	max 1%	max 1%]max 1%	max 1%	-	
3.	Insolubles totales	-	-	max 3%	max 3%	-	
4.	Metilsulfato de sodio	-	-	-	max 0.1%	-	
5.	alcohol metil, etil, o isopropílico libre (en bs)	max 1%	max 1%	max 1%	max 1%	-	
6.	Alcohol metílico	-	-	-	-	max 0.3%	
	Alcohol etílico	-	-	-	-	max 0.5%	
	Alcohol isopropílico	-	-	-	-	max 0.5%	
7.	Dióxido de azufre (en bs)	max 50 ppm	max 50 ppm	max 50 ppm	max 50 ppm	-	
8.	Contenido de nitrógeno (pectina) (en bs y libre de ceniza)	max 1%	-	max 2.5%	-	-	
9.	Contenido de nitrógeno (pectina amidada) (en bs y libre de ceniza)	-	max 2.5%	max 2.5%	-	-	
10.	Acido galacturónico (en bs y libre de ceniza)	min 65%	min 65%	min 65%	-	min 74%	
11.	Contenido de metoxilo (en bs pectina no estandarizada)	-	-	-	-	min 6.7%	
12.	Grado de amidación	-	max 25%	max 25%	max 25%	-	
13.	Azúcar y ácidos orgánicos	-	-	-	-	max 160 mg/g	
14.	Arsénico	max 3 ppm	max 3 ppm	-	-	max 3 ppm	
15.	Plomo	max 5 ppm	max 5 ppm	max 5 ppm	max 5 ppm	max 5 ppm	
16.	Cadmio	max 1 ppm	max 1 ppm	-	-	-	
17.	Mercurio	max 1 ppm	max 1 ppm	-	-	-	
18.	Metales pesados (como plomo)	max 20 ppm	max 20 ppm	-	-	-	
19.	Pesticidas	Acorde a regulaciones generales alimenticias					
20.	Gérmenes patógenos	Acorde a regulaciones generales alimenticias				Ausencia de especies de salmonella	
21.	Impurezas orgánicas volátiles	Acorde a regulaciones generales alimenticias				Limites definidos	

-= ninguna especificación

USP = farmacopea USA

JEFC = comité Ad-hoc en aditivos alimenticios

bs = base seca

FCC = Codex químico alimenticio

FDA = Administración federal de drogas y alimentos

UE = Unión Europea

FAO/WHO= Organización mundial de agricultura /organización mundial de la salud

Anexo 10 Determinaciones realizadas a la pectina obtenida

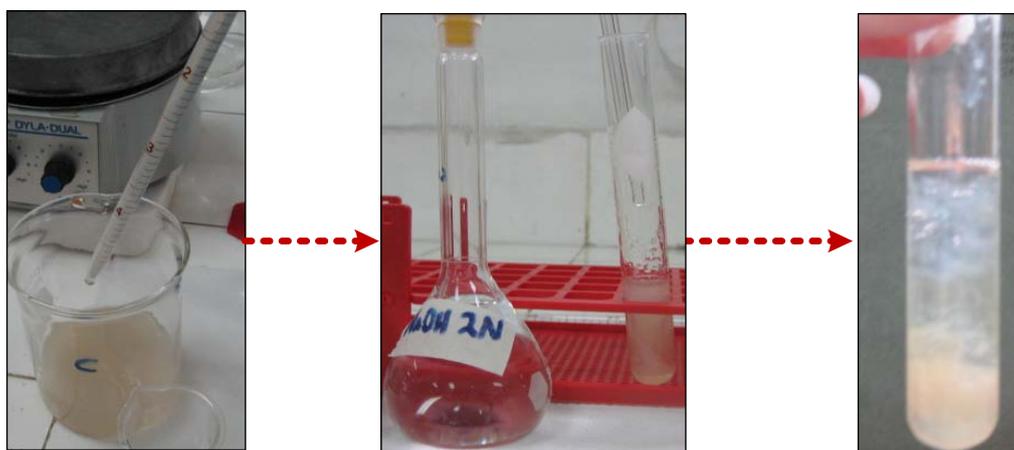
La metodología es la que se describe en The United States Pharmacopeia

A10.1 Métodos de identificación.

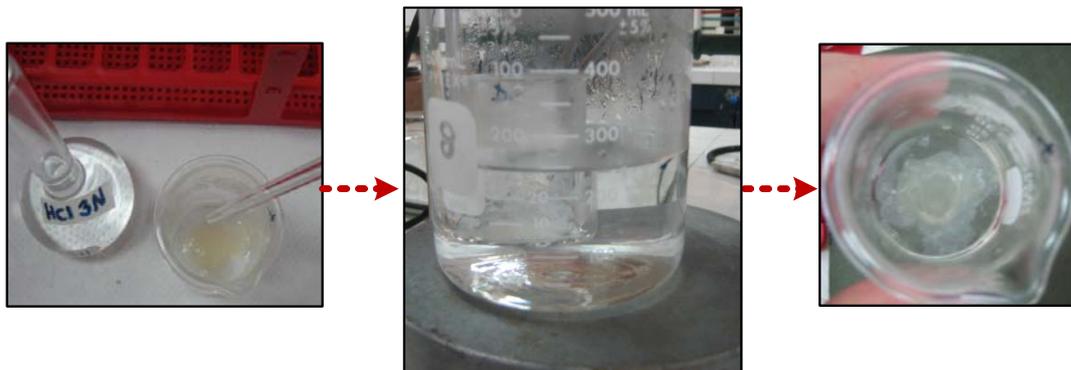
- a) A una solución (1 en 100), agregar un volumen igual de alcohol hasta que se forme un precipitado gelatinoso traslúcido (diferencia con las gomas).



- b) A 5 ml de una solución 1 en 100 de la muestra de pectina, agregar 1 ml de hidróxido de sodio 2 N y dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente, se forma un gel o un semigel (diferencia con tragacanto).



- c) Al gel obtenido en la prueba anterior, acidificarlo con ácido clorhídrico 3 N y agitar, se formara un precipitado gelatinoso voluminoso e incoloro, que por ebullición se torna blanco y floculento, indicando presencia de ácido péctico.



A.10.2 Número de metoxilo.

Colocar 5.00 g de pectina en un vaso de precipitado y agitar durante 10 minutos con una mezcla de 5 ml de ácido clorhídrico y 100 ml de alcohol al 60%, Pasar por un filtro de placa de vidrio aglomerado (tipo Gooch o Buchner, de 30 a 60 ml y de grano grueso), lavar con 6 porciones de 15 ml de una mezcla de ácido clorhídrico y alcohol al 60 %, hasta que el filtrado esté libre de cloruros. Finalmente lavar con 20 ml de alcohol y secar por una hora a 105 °C, enfriar y pesar.

Transferir exactamente una décima parte del peso neto de la muestra seca (que representa 500 mg de la muestra original sin lavar) a un erlenmeyer de 250 ml y humedecer con 2 ml de alcohol. Agregar 100 ml de agua libre de dióxido de carbono, tapar y agitar hasta la pectina está completamente disuelta. Agregar 5 gotas de fenolftaleína y titular con una solución de hidróxido de sodio 0.5 N VS, anotar el valor como valoración inicial. Agregar exactamente 20 ml de hidróxido de sodio 0.5 N VS. Tapar, agitar y dejar reposar 15 minutos. Luego agregar exactamente 20 ml de ácido clorhídrico 0.5 N VS y agitar hasta que desaparezca el color rosado.

Agregar 3 gotas de fenolftaleína TS, y valorar con solución de hidróxido de sodio 0.5 N VS hasta obtener una coloración rosada débil que persista después de agitar fuertemente la mezcla, anotar el valor de saponificación. Cada mililitro de hidróxido de sodio consumido es equivalente a 15.52 mg de grupos metóxilos ($-\text{OCH}_3$).



Pesar 0.5 g



Humedecer con etanol



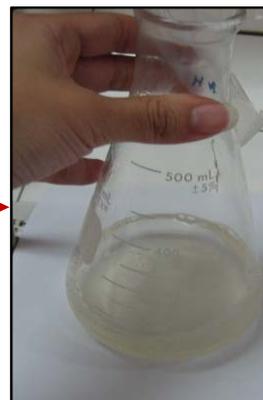
Agregar 100ml de agua libre de CO_2 .
Disolver



Agregar fenolftaleína y titular con NaOH 0.5 N VS



Agregar 20ml de NaOH 0.5 N.
Tapar agitar y dejar reposar 15 min



Agregar 20ml de HCl 0.5 N VS, agitar hasta desaparecer color rosa



Agregar 3 gotas de fenolftaleína y valorar con NaOH 0.5 N VS hasta obtener coloración rosa débil

A.10.3 Porcentaje de ácido galacturónico.

Cada mililitro de solución de hidróxido de sodio utilizado en la valoración total (valoración inicial + valoración de saponificación en los grupos metóxilos) es equivalente a 97.07 mg de ácido galacturónico ($C_6H_{10}O_7$).

A.10.4 Acidez.

En 100ml de agua a 80°C esparcir 0.5g de pectina lentamente en la superficie del agua, mientras se agita a velocidad alta la solución con agitador magnético. Determinar el pH de esta solución (concentración 0.5%) con pH metro



A.10.5 Humedad.

Pesar 0.5 g de pectina en polvo. Poner a secar en horno con ventilación a 100°C por 4 horas. Dejar enfriar en desecador por 20 minutos, pesar y llevar a peso constante.

El porcentaje de humedad se calcula se la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso de muestra} - \text{peso pectina seca}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$



A.10.6. Solubilidad

La pectina debe ser completamente soluble en agua caliente a una concentración de 2 a 5%, y soluble en agua fría a una concentración de 0.5% formando una solución coloidal opalescente.



Anexo 11 Análisis de Varianza (ANOVA)

Para determinar el nivel de importancia de cada efecto, se puede utilizar el cuadro ANOVA. Este, parte la varianza de la respuesta en varios componentes: uno para el efecto principal, uno para la interacción, y uno para el error experimental. El cuadro ANOVA muestra:

Suma de cuadrados: la suma de cuadrados Tipo III atribuible a cada término del modelo. Este mide el incremento en la varianza del error experimental que puede ocurrir si cada término es anulado del modelo. La suma de los cuadrados del error total se incluye también. Donde:

$$S_{error} = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

e_i es el i ésimo término residual, medido de la diferencia entre respuesta observada para la corrida i y el valor predicho en el modelo ajustado.

Grados de libertad (d.f.): los grados de libertad de cada término.

Media cuadrada: la media cuadrada del efecto, obtenida de dividir la suma asociada de cuadrados por sus grados de libertad. El error medio cuadrado (MSE) calcula la varianza del error experimental:

$$\hat{\sigma}^2 = MSE = \frac{S_{error}}{df_{error}}$$

Cociente F: Un cociente F que divide la media cuadrada de un efecto por el cuadrado del error de la media:

$$F = \frac{MS_{effect}}{MSE}$$

Los cocientes F pueden ser usados para determinar la importancia estadística de un efecto.

Valores P: el valor P asociado con la prueba de hipótesis nula. Si el coeficiente para un efecto seleccionado es igual a 0, implica que el efecto no está presente. P-Valores abajo de un nivel crítico (como 0.1 si opera al 10% nivel de significancia) indica que el correspondiente efecto es estadísticamente significativo a ese nivel.

R-cuadrado: el porcentaje de variabilidad en la variable respuesta que ha sido considerado por el modelo ajustado, se calcula de

$$R^2 = 100 \left(1 - \frac{S_{error}}{S_{total}} \right) \%$$

Los rangos de R-cuadrado van de 0% a 100% y mide que tanto el modelo se ajusta a los datos de la respuesta observada.

R-cuadrada (ajustada para g.l.): En situaciones donde el número de coeficientes en el modelo ajustado es grande con relación al número total de corridas, el R cuadrado estadístico puede exagerar la habilidad del modelo ajustado para predecir la respuesta. El R cuadrado ajustado compensa este efecto mediante:

$$R_{adj}^2 = 100 \left[1 - \left(\frac{n-1}{n-p} \right) \frac{S_{error}}{S_{total}} \right] \%$$

Donde p es el número de coeficientes estimados en el modelo ajustado.

Error estándar de la estimación: la desviación estándar estimada del error experimental, está dada por:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{MSE}$$

Este valor es utilizado cuando se construye los intervalos de predicción para la respuesta.

Error absoluto medio (Mean absolute error, MAE): la media de los valores absolutos de los residuales, dada por:

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |e_i|}{n}$$

Este valor indica el error medio en la predicción de la respuesta observada usando el modelo ajustado.

Estadístico Durbin-Watson (DW): es un estadístico calculado de los residuales de acuerdo a:

$$DW = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} (e_{i+1} - e_i)^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2}$$

Mide la correlación de la serie en los residuales para determinar si existe alguna dependencia entre observaciones sucesivas. En este caso, podría detectar derivas sobre el curso del experimento. Un pequeño valor P indicaría que el analista debe observar cuidadosamente los residuales en búsqueda de alguna tendencia.

Anexo 12 Ejemplo de cálculo para grupos metoxilo y ácido galacturónico

Cálculo para grupos metoxilo

Del cuadro 3.13 se tienen los volúmenes de la valoración necesarios para realizar los cálculos:

$$1 \text{ ml NaOH } 0.5 \text{ N} \rightarrow 15.52 \text{ mg OCH}_3$$

$$1.65 \text{ ml NaOH } 0.5 \text{ N} \rightarrow X$$

$$X = 25.608 \text{ mg OCH}_3 = 0.025608 \text{ g OCH}_3$$

$$0.5 \text{ g pectina sin lavar} \rightarrow 0.025608 \text{ g OCH}_3$$

$$100 \text{ g pectina} \rightarrow X$$

$$X = 5.1216 \text{ g OCH}_3$$

$$\begin{aligned} \text{En base seca} &= 100 - \text{Humedad} \\ &= 100 - 9.4 = 90.6 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\text{Base húmeda} \cdot 100 = \text{Base seca} \cdot X$$

$$5.1216 \text{ g OCH}_3 (100) = 90.6 \text{ g (X)} \quad \mathbf{X = 5.65\% OCH}_3$$

Cálculo para ácido galacturónico

$$1 \text{ ml NaOH } 0.5 \text{ N} \rightarrow 97.07 \text{ mg C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$$

$$4.35 \text{ ml NaOH } 0.5 \text{ N} \rightarrow X$$

$$X = 422.25 \text{ mg C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7 = 0.42225 \text{ g C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$$

$$0.5 \text{ g pectina sin lavar} \rightarrow 0.42225 \text{ g C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$$

$$100 \text{ g pectina} \rightarrow X$$

$$X = 84.45 \text{ g C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$$

$$\text{Base húmeda} \cdot 100 = \text{Base seca} \cdot X$$

$$84.45 \text{ g C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7 (100) = 90.6 \text{ g (X)} \quad \mathbf{X = 93.21\% C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$$