

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REOLOGICO DE LAS PECTINAS
CON DIFERENTE GRADO GALACTURONICO OBTENIDA A PARTIR
DE *Citrus paradisi* (GRAY FRUIT)

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
ELBA ELIZABETH ALFONSO GARCIA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE DE 2010

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC.DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE ÁREA DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS: FISICO QUÍMICO

Ing. Rina Lavinia Hidalgo de Medrano.

ASESORA DE ÁREA DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS: MICROBIOLÓGICO

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTE DIRECTOR

Ing. Sergio Armando Maravilla

AGRADECIMIENTOS.

A Jesús de Nazareno por darme la vida, fortaleza, y perseverancia durante mi camino a la culminación de esta carrera.

A mi familia por brindarme su amor, comprensión, apoyo y confianza incondicionalmente en cada paso de mi vida.

A la familia Villalta Castillo por su cariño, apoyo y confianza

A mi docente director Ing. Sergio Armado Maravilla por dedicarme su tiempo y conocimientos para lograr este paso.

A la coordinadora de trabajos de graduación Licda. María Concepción Odette Rauda, a las asesoras de áreas MSc Amy Elieth Moran y Ing. Rhina Lavinia H. de Medrano por la ayuda brindada para el desarrollo de mi trabajo de graduación.

Por esto y mucho mas **DEDICO** este logro a Jesús de Nazareno por ser mi guía, mi fuerza, mi fe y mi esperanza para seguir adelante en la vida.

A MI MAMI: Por ser mi inspiración, mi ejemplo, y por todo su amor y sacrificio para formarme en lo que soy.

A MIS HERMANOS: Por su amistad, amor, confianza, y por ser ellos

A MIS ABUELITOS: Por su amor, apoyo, cuidados, y por sus sabios y tiernos consejos.

Con todo mi amor

INDICE

Contenido	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xvi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	23
2.1 Objetivo general	
2.2 Objetivos específicos	
Capítulo III	
3.0 Marco teórico	25
3.1 La pectina y sus orígenes	25
3.2 Localización y estructura de la pectina	26
3.3 El grado de esterificación	28
3.4 Viscosidad de la pectina	30
3.5 Gelificación de la pectina	31
3.5.1 La longitud de la molécula	32
3.5.2 El grado de metilación	32
3.5.3 La proporción entre grupos hidrofóbicos e hidrofílicos	33
3.5.4 Factores del medio mas importante que influyen en la formación del gel.	33
3.5.4.1 Temperatura	33
3.5.4.2 pH	33
3.5.4.3 El azúcar y otros solutos similares	33

3.6 Reologia	34
3.6.1 Clasificación Reológica de los fluidos	35
3.6.1.1 Comportamiento independiente del tiempo	36
3.6.1.2 Comportamiento dependiente del tiempo	42
3.7 Aplicaciones de la pectina	46
3.7.1 Aplicaciones de la pectina en la industria alimentaria	46
3.7.2 Aplicaciones de la pectina en la industria farmacéutica	48
3.7.3 Otras Aplicaciones	50
3.8 Diseño Factorial 2^k	50
3.8.1 Diseño 2^k para $k \geq 3$ factores	51
3.8.2 Técnica de Yates para cálculo de contraste	52
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	54
4.1 Investigación bibliográfica	54
4.2 Investigación de campo	54
4.3 Parte experimental	55
4.3.1 Procedimiento de la extracción de la pectina	56
4.3.2 Caracterización de la pectina cruda	58
4.3.2.1 Identificación	58
4.3.2.2 Determinación de grupos metoxilos	58
4.3.2.3 Determinación de ácido galacturónico	60
4.3.2.4 Determinación del grado de esterificación	60
4.3.2.5 Determinación de la viscosidad	61
4.3.3 Análisis estadístico	62

Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	66
5.1 Rendimiento de pectina	66
5.2 Caracterización de la pectina cruda	76
5.3 Porcentaje de grupos metoxilo en muestra	76
5.4 Resultados de porcentaje de ácido galacturónico	86
5.5 Porcentaje del grado de esterificación	95
5.6 Viscosidad	104
5.7 Reogramas	113
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	131
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	134
Bibliografía.	
Glosario.	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Fig. N°	Pag
1. Estructura de la pectina	25
2. Cadena principal de residuos de acido galacturónico	26
3. Cadena estirada de la pectina	26
4. Localización de la pectina	27
5. Estructura de la pectina de alto grado de metoxilo	28
6. Estructura de la pectina de bajo grado de metoxilo	29
7. Diseño de experimento 2^3 combinaciones de variables	56
8. Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis	67
9. Gráfico de efectos principales para porcentaje de pectina	71
10. Gráfico de interacción de efectos para porcentaje de pectina	72
11. Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis	78
12. Gráfico de efectos principales para porcentaje de metoxilo	83
13. Gráfico de interacción de efectos para porcentaje de metoxilo	84
14. Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis	88
15. Gráfico de efectos principales para porcentaje de acido galacturónico	93
16. Gráfico de interacción de efectos para porcentaje de galacturónico	94
17. Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis	97
18. Gráfico de efectos principales para grado de esterificación	102
19. Gráfico de interacción de efectos para grado de esterificación	103
20. Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis	106

21. Gráfico de efectos principales para la viscosidad	111
22. Gráfico de interacción de efectos para la viscosidad	112
23. Reograma 1 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH:1.2; temperatura de 40° C y tiempo de 10 minutos	114
24. Reograma 2 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH:1.2; temperatura de 40° C y tiempo de 80 minutos	116
25. Reograma 3 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH:2.6; temperatura de 70° C y tiempo de 10 minutos	118
26. Reograma 4 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH: 2.6; temperatura de 70° C y tiempo de 80 minutos	120
27. Reograma 5 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH:1.2; temperatura de 70° C y tiempo de 10 minutos	122
28. Reograma 6 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH:1.2; temperatura de 70° C y tiempo de 80 minutos	124
29. Reograma 7 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH:2.6; temperatura de 70° C y tiempo de 10 minutos	126
30. Reograma 8 de pectina obtenida en las siguientes condiciones de pH:2.6; temperatura de 70° C y tiempo de 80 minutos	128

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág.
1. Procedimiento de identificación de pectina	57
2. Resultados de rendimiento en porcentaje de obtención según planteamiento del diseño 2 ³	65
3. Análisis de varianza para el rendimiento de porcentaje (p/p) con respecto a corteza seca.	66
4. Coeficiente de regresión para porcentaje de pectina	67
5. Respuesta optimizada para porcentaje de pectina	74
6. Resumen de condiciones de trabajo	75
7. Resultados de la identificación	75
8. Resultados obtenidos del porcentaje de Grupos metoxilo según planteamiento del diseño 2 ³	76
9. Análisis de la varianza para el porcentaje de metoxilo.	77
10. Coeficiente de regresión para porcentaje de metoxilo	82
11. Respuesta optimizada para porcentaje de metoxilo	82
12. Resultados obtenidos del porcentaje de Ácido galacturónico según planteamiento del diseño 2 ³ .	86
13. Análisis de la varianza para el porcentaje de ácido galacturónico	87
14. Coeficiente de regresión para porcentaje de ácido galacturónico	91

15. Respuesta optimizada para porcentaje de ácido galacturónico	92
16. Resultados obtenidos de la valoración para el grado de esterificación según planteamiento del diseño 2 ³	95
17. Análisis de la varianza para el porcentaje del grado de esterificación	96
18. Coeficiente de regresión para porcentaje de esterificación	101
19. Respuesta optimizada para porcentaje de esterificación	101
20. Resultados obtenidos de la viscosidad según planteamiento del diseño 2 ³	104
21. Análisis de la varianza para la viscosidad	105
22. Coeficiente de regresión para porcentaje viscosidad	109
23. Respuesta optimizada para porcentaje viscosidad	110
24. Cuadro comparativo de resultados obtenidos de porcentaje de metoxilos, porcentaje de ácido galacturónico y viscosidad	129

INDICE DE ANEXOS

Anexos N°	Pág.
1. Monografía de pectina USP 30	145
2. Descripción y clasificación botánica de planta y fruto de(<i>Citrus Paradisi</i>)	146
3. Material a utilizar	149
4. Equipo a utilizar	150
5. Reactivos a utilizar	151

RESUMEN

La pectina es una proteína que se obtiene de materia prima vegetal, principalmente de frutas, se usa en la industria de alimentos para darles propiedad de gel.

En esta investigación se evaluó un proceso de producción de pectina a partir de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) en donde al plantear un diseño 2^3 en el proceso de extracción a una temperatura de (40°C y 70°C), pH (1.2 y 2.6) y tiempo (10 min. y 80 min.); se evalúa el rendimiento de extracción de pectina, el porcentaje de ácido galacturónico, grado de esterificación y porcentaje de metoxilo. También se estudia el comportamiento reológico de cada una de las pectina obtenidas al evaluar su viscosidad a diferentes temperaturas y tener el reograma respectivo que se evalúan con el programa estadístico.

Los resultados de ácido galacturónico se comparan con lo establecido por la USP 30 y así poder ver en cuales casos de combinación de variables de extracción se tienen pectinas de grado farmacéutico; igual trabajo se hace para los porcentajes de metoxilo y grado de esterificación.

Para cada respuesta obtenida como el porcentaje de rendimiento de pectina, grado galacturónico, porcentaje de metoxilo, grado de esterificación y viscosidad se comparan dichos resultados utilizando el programa estadístico Stargraphics, el que permite predecir que variables de operación son importantes y si la

combinación de ellas lo es también; esto permite predecir que pectina obtener para un determinado uso específico.

Como resultado del diseño 2^3 se tienen resultados de rendimiento máximo de pectina 61.69% al trabajar con temperatura máxima (70°C), pH mínimo(1.2) y tiempo máximo (80 min.); y en donde el análisis de Stargraphic nos dice que el factor temperatura y el factor tiempo son verdaderamente importantes.

Para tener pectinas con metoxilo de grado farmacéutico se debe de trabajar a pH de 1.2 temperatura de 40°C independiente del tiempo de extracción, Stargraphic nos dice que es mas importante el pH que el tiempo; igualmente se puede afirmar para porcentaje de acido galacturónico, pero para este caso son importantes la temperatura y el pH.

Las pectinas de mayor viscosidad se obtienen al trabajar con temperatura baja (40°C), pH alto (2.6) y tiempo alto y que por el análisis de Stargraphic se puede determinar que es importante el pH y el tiempo.

CAPITULO I
INTRODUCCION.

1.0 INTRODUCCIÓN

En la actualidad en el país, los desechos agrícolas e industriales constituyen un problema de contaminación ambiental, en particular los subproductos de frutas cítricas utilizadas en la elaboración de jugos y mermelada; por otra parte la falta de materias primas nacionales para la industria farmacéutica y alimenticia, nos permite buscar los recursos naturales que podrían explotarse.

Esta situación motiva a investigar los beneficios obtenidos de los desechos cítricos como las cáscaras de toronjas, las cuales son ricas en sustancias pécticas y azúcares; entre estas sustancias pécticas, la más demandada en la industria es la pectina que es uno de los principales constituyentes de la pared celular de los vegetales y forman parte importante de los componentes característicos de las frutas cítricas. Estas macromoléculas son polisacáridos altamente hidrofílicos que pueden absorber varias veces su peso en agua. Su estructura básica la forman moléculas de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glicósidos que constituyen el ácido poligalacturónico, de aquí viene su capacidad viscosante y gelificante.

Es por ello que el presente trabajo tiene por finalidad el estudio de los reogramas formados con las pectinas obtenidas por hidrólisis ácida de las cáscaras de toronja, donde las variables a tener en cuenta son: pH = 1.2 y pH = 2.6; temperatura de 40° C y 70° C y tiempo de extracción de 10 minutos y 80 minutos.

Con estos cambios se esperan obtener pectinas con diferentes porcentajes de ácido galacturónico. Para mayor comprensión de los resultados se formará el reograma respectivo que nos ayudará gráficamente a demostrar su comportamiento.

Existen diversos diseños estadísticos para este tipo de análisis pero en esta investigación se trabaja con valores extremos de las variables y el mejor método para su análisis es el diseño factorial dos al cubo, el cual permite la intervención de varios factores y el estudio del efecto de estos en conjunto.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el comportamiento reológico de las pectinas con diferente grado galacturónico obtenida a partir de *Citrus paradisi* (*Gray Fruit*).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Obtener pectina utilizando el método de hidrólisis ácida
- 2.2.2 Determinar mediante un diseño experimental dos al cubo las variables óptimas para la extracción de pectina.
- 2.2.3 Evaluar el porcentaje de pectina obtenida por el método de hidrólisis ácida.
- 2.2.4 Identificar el grado de esterificación de pectina obtenida por hidrólisis ácida de la *gray fruit*
- 2.2.5 Evaluar el porcentaje de ácido galacturónico y el efecto de éste en el reograma formado.
- 2.2.6 Estudiar el comportamiento reológico de las pectinas obtenidas.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 LA PECTINA Y SUS ORÍGENES ⁽⁵⁾

La pectina fue descubierta en 1790 cuando Vauquelin encontró primeramente una sustancia soluble de los zumos de fruta. El científico francés Braconnot continuo el trabajo de Vauquelin y encontró que una sustancia ampliamente disponible de plantas vivas y ya observada en el pasado, tenía propiedades gelificantes cuando se le añadía ácido a su solución la llamó “pectina ácida” del griego “pectos” que significa sólido coagulado.

La pectina fue definida por Kertesz, como los ácidos pectínicos solubles en agua de grado de metilación variada que son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones determinadas. Esta definición abarca la gelificación con calcio de los ácidos poligalacturónicos coloidales aislados de plantas conteniendo una cierta proporción de grupos metiléster. De ahí que también el término pectina se usa colectivamente para incluir ácido péctico, la forma de pectina completamente desesterificada.

Las formas de pectinas son generalmente reconocidas como seguras por las U.S. Food and Drug administration. Las especificaciones legales para pectinas están enunciadas internacionalmente.

3.2 LOCALIZACION Y ESTRUCTURA DE LA PECTINA ⁽⁵⁾

Las sustancias pécticas son mezclas complejas de polisacáridos que constituyen una tercera parte de la pared celular de las plantas dicotiledóneas y de algunas monocotiledóneas, menor proporción de estas sustancias se encuentran en las paredes celulares de las plantas herbáceas. El principal constituyente de los polisacáridos pécticos es el ácido α -D-galacturónico unido en cadenas por medio de enlaces glicosídicos α (1-4).

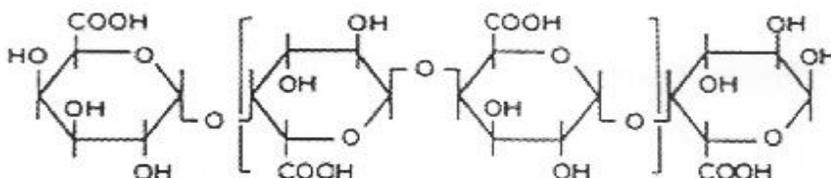


Figura N° 1: Estructura de la pectina.

Hay monómeros de ramnosa insertados dentro de la cadena principal de residuos de ácido galacturónico. Unido al extremo reductor de los mismos por enlaces (1 α – 2 β) y al extremo no reductor del siguiente residuo urónico por enlaces (1 β - 4 α)

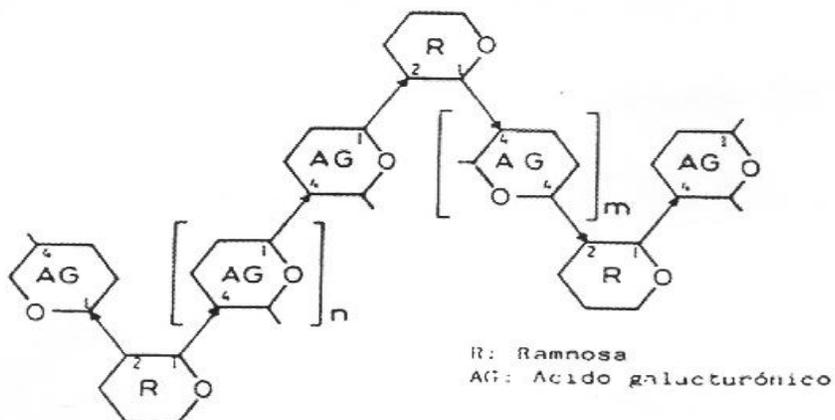


Figura N° 2: Cadena principal de residuos de ácido galacturónico

La ramnosa introduce un plegamiento en la que sería una cadena estirada. Otros monómeros serían galactosa, arabinosa, xilosa, ácido glucorónico que formarían la estructura.

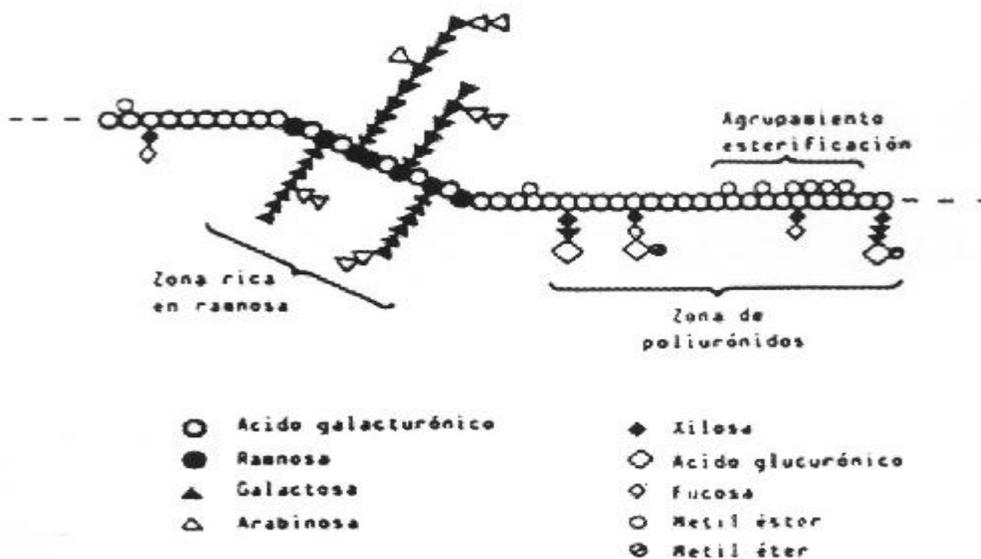


Figura N° 3: Cadena estirada de la pectina.

Las sustancias pécticas se encuentran en la mayor parte de los tejidos vegetales y muy especialmente en los tejidos parenquimáticos y meristemáticos. En ellos, las zonas mas ricas corresponden a la pared primaria de las células y a la lámina media que las separa.

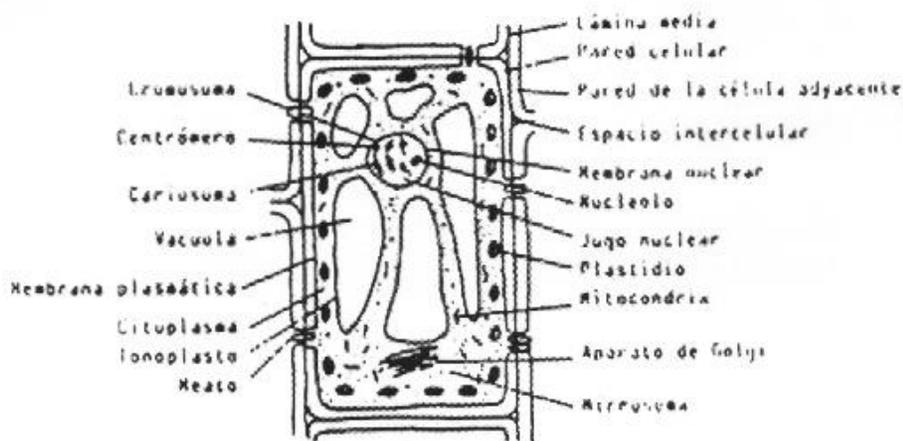


Figura N°4: Localización de la pectina.

La función biológica de la pectina en las plantas fija hasta un 30 % de los polisacáridos de muchas plantas. El ión calcio induce enlaces entrecruzados en la adhesión celular y textura del tejido, así como la extensibilidad de la pared celular. A pesar del alto grado de metilación de las pectinas en las partes crecientes de la planta.

3.3 El grado de esterificación ⁽⁵⁾

Un factor importante que caracteriza las cadenas de pectina es el grado de esterificación (DE) de los grupos carboxilos de los residuos de ácido urónico con alcohol metílico las pectinas probablemente se forman inicialmente en forma

altamente esterificada, pero experimentan algo de desesterificación después de insertarse en la pared celular o lámina media. Hay una amplia gama de grados de esterificación dependiendo de especies, tejido y madurez. En general las pectinas del tejido tienen una gama de grados de esterificación que va del 60% al 90%. El grado de metilación tiene un papel muy importante en la firmeza y cohesión de los tejidos vegetales. La reducción del grado de metilación tiene como consecuencia un aumento de la cohesión que particularmente es evidente en tejidos calentados. El efecto de fortalecimiento de los tejidos implica dos fenómenos separados.

En tejidos frescos, la formación de carboxilos libres incrementa las posibilidades y la fortaleza de los enlaces calcio entre polímeros. En los tejidos calentados se dá la combinación de un incremento de los enlaces de calcio y un decremento de la susceptibilidad de la pectina a despolimerizarse por la β – eliminación.

Las pectinas están clasificadas como alto metoxilo (HM) y bajo metoxilo (LM) lo que depende del grado de esterificación.

La separación entre HM y LM es arbitraria del 40% al 50% de DE

Donde: HM significa Alto Metoxilo

LM significa Bajo Metoxilo

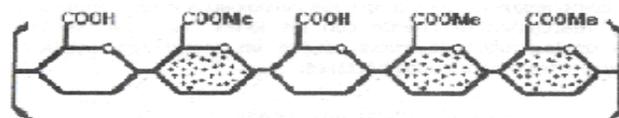
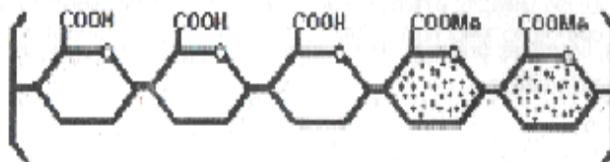


Figura N°5: Estructura de pectina de alto grado de metoxilo.



FiguraN° 6: Estructura de pectina de bajo grado de metoxilo.

3.4 VISCOSIDAD DE LA PECTINA ⁽⁵⁾

La viscosidad de las soluciones de pectina de HM es muy dependiente del número de variables: grado de esterificación, longitud de la molécula, concentración de electrolitos, pH y temperatura. Las concentraciones diferentes de un azúcar y distintas azúcares afectan a la viscosidad de distinta forma. 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.

En dispersiones de pectina una propiedad muy útil de la viscosidad es la resistencia del gel (soluto) a fluir en relación al agua conteniendo un electrolito. El objeto del electrolito es la de disminuir la ionización de los grupos carboxilos de la pectina. La pectina entonces pasa a ser un electrolito neutro en vez de comportarse como un electrolito con gran efecto electroviscoso.

3.5 LA GELIFICACIÓN DE LA PECTINA ⁽⁵⁾

Desde el punto de vista de la tecnología alimentaria la propiedad más importante de las pectinas es su aptitud para formar geles. Los geles consisten en moléculas poliméricas con enlaces entrecruzados en la red, interconectada y tupida, inmersa en un líquido en geles de pectina y otros sistemas de alimentos conteniendo pectina, este líquido es agua. Las propiedades del gel son el resultado neto de interacciones complejas entre el soluto y el solvente, la influencia del agua como solvente, la naturaleza y magnitud de las fuerzas intermoleculares que mantienen la integridad del gel que permiten tener una gran capacidad de retención de agua.

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. Las pectinas con HM son también de set rápido y lento.

El ritmo de gelificación disminuye cuando disminuye el grado de esterificación; los geles de pectina de HM son más rápidos en alcanzarse que los de LM. Los geles de pectina HM con alto grado de esterificación se alcanzan más rápidamente que las 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 de 25 a 30 minutos para que las burbujas de aire atrapadas puedan escapar. Las pectinas de set rápido

permiten jaleas de productos en la gama de pH entre 3.3 a 3.5, las set lento las permiten entre 2.8 a 3.2 una mezcla de HM y LM impartirán cierto grado de tixotropía a una jalea.

Las cualidades de la pectina que influyen en los caracteres del gel son:

3.5.1 La longitud de la molécula₍₅₎

Condiciona la rigidez o firmeza del gel, a valores de longitud muy bajos una pectina no forma gel, cualquiera que sea la dosis empleada y las restantes condiciones del medio.

3.5.2 El grado de metilación₍₅₎

Contribuye por un lado a regular la velocidad de gelificación y por otro es responsable de algunas propiedades organolépticas de los geles.

3.5.3 La proporción entre grupos hidrofòbicos e hidrofílicos₍₅₎

La molécula de la pectina determina la Solubilidad de ésta; el grupo éster es menos hidrofílico que el grupo ácido y en consecuencia una pectina de alto metoxilo y alto grado de esterificación gelifica a temperaturas más altas que otra con menor grado de esterificación. Esta diferencia se refleja en la clasificación de las pectinas que pueden ser : pectinas de gelificación rápida, normal o lenta.

3.5.4 Los factores del medio más importante que influyen en la formación de los geles⁽⁵⁾

3.5.4.1 Temperatura: Cuando se enfría una solución caliente que contiene pectina, las energías térmicas de las moléculas decrecen y su tendencia a gelificar aumenta. Cualquier sistema que contenga pectina, tiene un límite superior de temperatura por encima de la cual la gelificación nunca ocurrirá. Por debajo de esta temperatura crítica, las pectinas de bajo metoxilo gelifican casi instantáneamente mientras que la gelificación de las de alto metoxilo depende del tiempo. En contraste con las pectinas de bajo metoxilo, las de alto, son termo reversibles.

3.5.4.2 pH: La pectina es un ácido con pH de aproximadamente 3.5 un porcentaje alto de grupos ácidos disociados respecto a los no disociados hace la pectina mas hidrofílica. Por lo tanto la tendencia a gelificar aumenta considerablemente al bajar el pH. Esto se hace especialmente evidente en pectinas de alto metoxilo, las cuales requieren normalmente un pH por debajo de 3.5 para gelificar.

3.5.4.3 El azúcar y otros solutos similares. Estos hidratos de carbono, tienden generalmente a deshidratar las moléculas de pectina en solución cuantos más sólidos en solución hay menos agua disponible para actuar como disolvente de la pectina y por lo tanto la tendencia a gelificar se favorece

En valores de sólidos solubles superiores al 85% el efecto deshidratante es tan fuerte que la gelificación de la pectina es muy difícil de controlar. Las pectinas

de alto metoxilo gelifican a valores de sólidos solubles por encima del 55%. Para cada valor de pH en el cual la gelificación es óptima y un rango de pH en el cual la pectina se puede gelificar.

Las pectinas de bajo metoxilo pueden gelificar a cualquier valor de sólidos solubles. La temperatura de gelificación disminuye al disminuir el contenido de sólidos solubles.

3.6 REOLOGÍA₍₅₎

La reología es la ciencia que estudia el flujo de las deformaciones de sólidos y fluidos bajo la influencia de fuerzas mecánicas. En la industria se trabaja muy frecuentemente con productos que se encuentran en fase líquida, por tanto es muy importante conocer en todo momento características reológicas de los líquidos que intervienen en los procesos industriales de cara a optimizar estos procesos evitando así gastos innecesarios debido principalmente al sobredimensionamiento de los equipos como bombas, conducciones, evaporadores, etc.

Es por ello que es imprescindible el definir una serie de modelos reológicos que recojan lo más fielmente posible las características de flujo de los productos que trata la industria. Estos modelos reológicos se basan en el cálculo experimental de una serie de constantes que caracterizan el flujo para cada producto en las variables de operación en que se encuentra.

3.6.1 CLASIFICACIÓN REOLÓGICA DE LOS FLUIDOS⁽⁵⁾

Se puede hacer una primera distinción entre fluidos con comportamiento newtoniano y no newtoniano según obedezcan a la ley de Newton de la viscosidad $T=KD^n$

DONDE: K = Constante

n = 1 para fluidos newtonianos

D = velocidad de cizallamiento

T = tensión de cizallamiento

Para los fluidos newtonianos la función viscosidad es constante siendo precisamente su valor el de la viscosidad newtoniana. En los fluidos no newtonianos ya no se puede hablar de la viscosidad ya que la relación entre el esfuerzo y la velocidad de deformación no es constante en este caso se define la viscosidad aparente la cual es función de la velocidad de deformación

Una segunda clasificación distingue los fluidos dependientes del tiempo y su viscosidad a una determinada temperatura, solo depende de la velocidad de deformación. Los fluidos dependientes del tiempo son aquellos cuya viscosidad depende del gradiente de velocidad y del tiempo en que actúa dicho gradiente.

Además hay un tipo de fluido que tiene un comportamiento entre fluido viscoso y sólido elástico, son los llamados fluidos viscoelásticos se puede realizar una clasificación de los fluidos de la siguiente forma:

A. Comportamiento independiente del tiempo

A.1 Comportamiento newtoniano

Es el comportamiento de aquellos fluidos que cumplen la ley de newton de la viscosidad, la cual indica que cuando un líquido es sometido a un esfuerzo cortante dicho esfuerzo es directamente proporcional al gradiente de deformación, siendo la viscosidad la constante de proporcionalidad al gradiente de velocidad de deformación.

La viscosidad de fluidos newtonianos es únicamente función de la temperatura y composición siendo independiente del tiempo, la velocidad de formación y la historia de esta. Ejemplo de estos son: soluciones azucaradas, zumos de frutas clarificadas y despectinizadas, leche, etc.

A.2 Comportamiento no newtoniano

El comportamiento reológico de este tipo de fluidos queda completamente caracterizado por una simple relación entre esfuerzo aplicado y la velocidad de deformación a una temperatura. Esto es debido a que la viscosidad solo depende del gradiente de velocidad. Este grupo de fluidos engloba tres comportamientos diferenciados:

1. Fluidos con comportamiento plástico.
2. Fluidos Pseudo plástico
3. Fluidos Dilatantes.

A.2.1 Fluidos con comportamiento plástico

Estos fluidos tienen un umbral mínimo de fluencia (yield-stress) que se debe superar para que empiecen a fluir. Dichos fluidos en reposo presentan una estructura tridimensional con una rigidez suficiente para soportar cualquier esfuerzo aplicado que sea inferior al umbral de fluencia. Si el esfuerzo aplicado es mayor, esta estructura se rompe y el fluido comienza a fluir. Si dicha fuerza deja de actuar o toma un valor por debajo del umbral de fluencia, la estructura se reconstituye. Es muy importante el cálculo de este umbral de fluencia para conocer cuál es el esfuerzo mínimo que se debe aplicar para que empiecen a fluir este tipo de fluidos. $T = T_0 + KD^n$

Donde: T = Umbral de fluencia.

T_0 = Umbral de fluencia inicial

K = Valor constante

D = Velocidad de cizallamiento

A.2.2. Fluidos pseudoplásticos (Sheer thinning)

En este tipo de fluidos la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de deformación. Los fluidos que presentan este tipo de comportamiento se caracterizan por tener partículas de forma irregular dispersas en la fase líquida. En reposo estas partículas se encuentran desordenadas, lo cual origina una gran resistencia interna al flujo. A medida que aumenta la velocidad de deformación, las partículas se orientan en la dirección del flujo, disminuyendo así la resistencia al deslizamiento y por lo tanto también

disminuye la viscosidad. Este tipo de comportamiento es muy usual en los fluidos siendo quizás el comportamiento no newtoniano el más común. Ejemplos de fluidos pseudoplásticos son: zumos de frutas concentradas clarificados, puré de frutas y vegetales, etc.

A.2.3. Fluidos dilatantes (Sheer thickening)

En este tipo de fluidos su viscosidad aparente aumenta al hacerlo la velocidad de deformación.

Estos fluidos cuando se someten a gradientes bajos de velocidad, las partículas están suficientemente empaquetadas para que el líquido llene los huecos entre partículas actuando como lubricante y haciendo por lo tanto que la viscosidad sea baja. Al aumentar la velocidad también aumentan los huecos y no hay suficiente líquido para lubricar el roce de las partículas aumentando por lo tanto la viscosidad aparente. Este comportamiento se observa muy raramente, se presenta en ciertos tipos de miel y también en suspensiones de almidón cocinados.

Modelos Reológicos para fluidos no newtonianos₅

- Ley de la Potencia de Ostwald:

Esta ecuación relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación según la expresión: $r = K (\dot{\gamma})^n$

Donde:

r = umbral de fluencia

K = Índice de consistencia

n = Índice de comportamiento al flujo

$n < 1$ = Describe el comportamiento Pseudoplástico

$n > 1$ = Describe el comportamiento de Fluidos dilatantes

- Ecuación de Bingham:

Este es un modelo utilizado para describir el comportamiento plástico, en el que aparece un umbral de fluencia que debe superarse para que el fluido empiece a fluir. La expresión es la siguiente: $\tau = \tau_0 + n'\dot{\gamma}$

Donde:

τ = Umbral de fluencia

τ_0 = Umbral de fluencia inicial

n = Viscosidad plástica

- Ecuación de Herschel-Bulkley.

Este es una generalización de la ley de la potencia en la que se incluye un nuevo parámetro que es el umbral de fluencia.

$$\delta = \delta_0 + K_H (\dot{\gamma})^n$$

Donde:

δ_0 = umbral de fluencia

K_H = índice de consistencia

n = índice de comportamiento

- Efecto de la Temperatura.

Para fluidos newtonianos se utiliza generalmente una ecuación del tipo Arrhenius que relaciona la viscosidad con la temperatura, en el caso de fluidos no newtonianos se relaciona normalmente la viscosidad aparente con la temperatura a una velocidad de giro determinada, aunque también se puede usar el índice de consistencia en lugar de la viscosidad aparente.

La ecuación que se utiliza es la siguiente:

$$n_a = n^\infty \exp (E_a/RT)$$

Donde:

n_a = Viscosidad aparente

E_a = Energía de activación

n^∞ = Constante viscosidad de deformación infinita

R = Constante de gases perfectos.

T = Temperatura en grados Kelvin

La temperatura afecta a los distintos parámetros reológicos de la siguiente forma:

- La viscosidad, viscosidad aparente o el índice de consistencia disminuye al aumentar la temperatura.
- Generalmente se observa que el índice de comportamiento al flujo no varía con la temperatura, aunque en algunos casos se ha detectado un

aumento del índice de comportamiento al flujo, al aumentar la temperatura pudiéndose pasar de un comportamiento pseudoplástico a newtoniano.

- Por otro lado el umbral de fluencia suele disminuir al aumentar la temperatura.

- Efecto de la concentración.

- Un aumento de la concentración implica un incremento de la viscosidad o del índice de consistencia. En la bibliografía se encuentran principalmente dos tipos de ecuaciones que relacionan la viscosidad o el índice de consistencia con la concentración; uno es el modelo potencial y el otro es el modelo exponencial, sus expresiones son las siguientes:

$$y = K_1 (C)^{A_1} \quad \text{POTENCIAL}$$

$$y = K_2 \exp (A_2 C) \quad \text{EXPONENCIAL}$$

Donde:

$K_1, A_1 =$ Constantes para ecuación potencial

$K_2, A_2 =$ Constantes para ecuación exponencial

$y =$ Viscosidad o índice de consistencia

$C =$ Concentración

La expresión potencial se utiliza en alimentos tipo purés, mientras que la exponencial da resultados en zumos y pastas, la concentración también afecta el umbral de fluencia ya que aumenta al aumentar la concentración; por otro

lado el índice de comportamiento al flujo puede no verse afectado por la concentración o bien, disminuir cuando ésta aumenta.

- Efecto combinado temperatura – concentración.

En la industria es muy importante el obtener una sola expresión que relacione el efecto de la temperatura y la concentración sobre la viscosidad. En la práctica se utilizan dos tipos de ecuaciones, una exponencial y otra potencial, que resultan de combinar la ecuación tipo Arrhenius del efecto de la temperatura con la ecuación exponencial y potencial del efecto de la concentración. Respectivamente sus expresiones son:

$$\eta_a = \alpha_2 \text{Exp} (\beta_2 C + E_a / RT)$$

$$\eta_a = \alpha_1 (C)^{\beta_1} \text{Exp} (E_a / RT)$$

Donde:

Ea = Energía de activación al flujo

R = Constante de gases perfectos

T = Temperatura en grados Kelvin

C = Concentración

B. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DEPENDIENTE DEL TIEMPO.

Los fluidos que presentan un comportamiento dependiente del tiempo se caracterizan porque su viscosidad aparente depende además de la velocidad de deformación, también del tiempo en que está actuando el gradiente de velocidad. Este tipo de fluidos se clasifican en tixotrópicos y reopécticos, según

si el esfuerzo que provoca la deformación a un gradiente de velocidad determinado, disminuya o aumente con el tiempo respectivamente.

B.1 FLUIDOS TIXOTRÓPICOS

En este tipo de fluidos el esfuerzo cortante asociado a un gradiente de velocidad disminuye con el tiempo y la viscosidad aparente también experimenta un descenso. Para explicar este comportamiento reológico se supone que al aplicar un esfuerzo cortante se producen roturas en la estructura interna del fluido y por lo tanto para mantener un mismo gradiente de velocidades se necesita cada vez menor esfuerzo cortante.

La tixotropía se puede considerar como similar a la pseudoplasticidad si se supone que el tiempo necesario para que se alineen las partículas en el sentido del flujo es despreciable.

La caracterización puede realizarse de dos maneras:

- a) Puede representar la variación de δ frente a un gradiente de velocidad $\dot{\gamma}$, aumentando la velocidad de deformación hasta un máximo y después ir disminuyendo. De esta forma se obtiene un ciclo de histéresis según el sentido horario en el cual el área encerrada es una medida de la tixotropía de la muestra.
- b) El método más utilizado consiste en ver la variación del esfuerzo cortante con el tiempo a una velocidad de deformación fijada.

En la práctica se definen una serie de parámetros para la caracterización tixotrópica de los alimentos. Los parámetros más usuales son: el coeficiente de rotura con el tiempo (D) que da una idea de la velocidad de rotura de la estructura con el tiempo a un $\dot{\gamma}$ fija y, por otro lado, se define el coeficiente de ruptura tixotrópica debido al aumento de la velocidad de deformación. Las ecuaciones para hallar estos parámetros son los siguientes:

$$D = (\eta_1 - \eta_2) / (\ln [t_1 - t_0])$$

$$M = (\eta_1 - \eta_2) / (\ln (N_1/N_2))$$

DONDE: D = Coeficiente de ruptura dependiente del tiempo

M = Coeficiente de ruptura dependiente del giro del rotor

η_1 y η_2 = Viscosidad del fluido a los tiempos t_1 y t_2

N_1 y N_2 = Velocidad de giro del rotor a los tiempos t_1 y t_2 . respectivamente.

Además de las formas ya descritas para la caracterización tixotrópica, existen unos modelos que se basan en la aplicación de unas ecuaciones que definen la tixotropía del fluido.

- **Modelo de Weltman** $\delta = A - B \ln t$

Donde: A = tensión necesaria para que comience la tixotropía

B = cantidad de estructura que se degrada durante cizallamiento.

ln = Logaritmo natural

t = tiempo

- Modelo de Hahn

$$\ln (\delta - \delta_e) = p - at$$

Donde:

p = tensión tangencial necesaria para que comience la tixotropía

a = informa sobre la velocidad del proceso de degradación estructural y depende de la resistencia del fluido a la tensión cortante que se le aplica.

- Modelo de Tio y Boger

$$\delta = [\delta_0 + K_H (y)^n] \lambda$$

Donde : k_H = índice de consistencia

Este es un modelo cinético reológico basado en el modelo de Herschell – Bulkley, multiplicado por el parámetro λ que varía desde el valor unidad para un tiempo cero de deformación hasta un valor λ de equilibrio.

- Modelo de Figoni y Shoemaker

En este modelo cinético se supone que el descenso del esfuerzo cortante es una suma de funciones cinéticas de primer orden.

$$\delta_1 - \delta_e = \sum (\delta_{0,i} - \delta_{e,i}) \exp. (-K_i t)$$

Donde:

K_i = constante cinética de degradación estructural.

Ejemplos de fluidos con comportamiento tixotrópico son la leche condensada, la mayonesa, la clara de huevo, zumos de frutas muy concentradas, miel, etc.

B.2 FLUIDOS REOPÉCTICOS

Este tipo de fluidos presentan la propiedad de aumentar su viscosidad aparente con el tiempo cuando son sometidos a un determinado gradiente de velocidad. Esto se explica por el fenómeno de formación de una estructura al aplicar un esfuerzo sobre estos fluidos. El comportamiento reopéctico, no obstante, no ha sido hallado todavía en ningún producto alimentario.

3.7 APLICACIONES DE LA PECTINA⁽⁵⁾

3.7.1 Aplicaciones de la pectina en la industria alimentaría.

- El uso de la pectina en mermeladas de alto contenido de azúcar es una de las más conocidas aplicaciones a uno de los mercados más grandes para la pectina.
- Las mermeladas a menudo están hechas a partir de concentrados de frutas despectinizadas y entonces requerirán gran cantidad de pectina añadida del tipo de fruta en cuestión.
- Las pectinas de alto metoxilo son usadas solamente en jaleas estándar por encima del 60% de sólidos solubles.
- La selección de la pectina correcta es importante, pero el contenido en el fruto es también importante. A veces especialmente en bajo contenido de sólidos solubles es necesario añadir sal de calcio para obtener el mejor resultado. Ocasionalmente se añaden gomas neutras para reducir la sinéresis.

- Es muy importante el control de pH.
- Pueden prepararse gamas de glaseados para pastelería y flanes, mediante una formulación con pectina de bajo metoxilo amidada y secuestrante de calcio como difosfatos.
- Un área creciente de la producción de frutas en los últimos años ha sido la producción de bases de frutos para la adición a yogurts y productos similares. Estas bases de frutos que contienen entre el 20% y 60% de azúcar han sido elaboradas con almidones modificados como espesantes. A pesar de lo económico de su precio, presentan problemas como enmascaramiento del aroma y textura irregular y han sido sustituidos ventajosamente por pectina de bajo metoxilo amidada.
- La pectina tiene otros usos en la industria láctea. La pectina de alto metoxilo preserva a los productos lácteos de la adición de caseína cuando se calienta a valores de pH inferiores a 4.3. Este efecto se usa para estabilizar la yogurts líquidos y tratados con VHT y también para mezclas de leche y zumos de fruta, también estabiliza bebidas lácteas acidificadas con soya y productos basados en el trigo, donde evita la precipitación de proteínas. El yogurt puede espesarse mediante la adición de niveles muy bajos de pectinas de bajo metoxilo amidada.
- La gelatina ha sido la base tradicional para los postres de jaleas, se formulan con pectinas amidadas de bajo metoxilo que proporciona la textura y el producto de congelación adecuadas.

3. 7.2 Aplicaciones de la pectina en la industria farmacéutica⁽⁵⁾

- La base de las aplicaciones farmacéuticas de la pectina son sus propiedades hidroalcaloidales y terapéuticas. Además frecuentemente produce un efecto de sinergia y aumenta la acción de otros principios activos componentes de la especialidad.
- La acción antidiarréica es la propiedad más universalmente conocida. Este efecto se acompaña frecuentemente de una acción antivomitiva, permitiendo mejor tolerancia a los alimentos, esto es sin duda consecuencia del papel protector y regulador del sistema gastrointestinal en este sentido, las pectinas de alto metoxilo asociados a otros principios activos, tienen una gran utilización en los tratamientos de gastritis y úlceras, ya que de ser ingerida cubre las paredes estomacales con una especie de película más o menos gelificada y la protege de hipersecreciones gástricas y biliares.
 - Su acción en la pared intestinal es análoga, además se añade una acción desintoxicante, debido al poder absorbente y secuestrante de la macromolécula péctica, que permite la inhibición de toxinas, esta propiedad se utiliza a veces en casos de envenenamiento por metales.
 - Las dietas que contienen pectinas incorporadas a un alimento parecen ser mejor toleradas y pueden consumirse mayores cantidades que cuando se consume la pectina en polvo o en cápsulas. El consumo de pectina por individuos, normales o hipercolesterolémicos se ha comprobado que ha tenido como efecto la disminución de los niveles de colesterol en la sangre,

sin cambiar los niveles de triglicéridos o HDL. La mayor disminución de los niveles de colesterol sanguíneo fue en los sujetos hipercolesterolémicos.

- Las dietas de bajo contenido en grasa y dietas suplementadas con más de 6 gramos de pectina al día generalmente producen el mayor cambio en los niveles de colesterol.
- En la excreción intestinal se comprobó que los lípidos tales como esteroides, ácidos biliares y otros quedaban atrapados en el gel de pectinas y no podían ser absorbidos en el intestino delgado.
- El consumo de pectina por individuos normales y diabéticos produce disminución de la curva de respuesta de glucosa después de las comidas con dosis de pectina adicionada, la curva de respuesta de insulina también decreció de manera similar en respuesta a la pectina en aproximadamente dos tercios de los estudios en que se midió la insulina.
- La hipoglicemia y el síndrome de reflujo gástrico disminuyen y mejoran respectivamente cuando es consumida pectina con la comida.

3.7.3 OTRAS APLICACIONES DE LA PECTINA₍₅₎

Además de las aplicaciones expuestas anteriormente puede citarse otros usos que también son importantes

- Uso en odontología
- Productos cosméticos
- Manufactura de cigarrillos

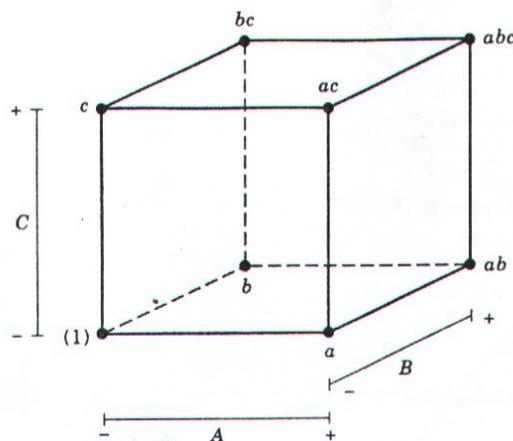
3.8 DISEÑO FACTORIAL 2^K (6)

Los diseños factoriales se emplean con frecuencia en experimentos en los que intervienen varios factores y donde es necesario estudiar el efecto conjunto de ellos sobre la respuesta.

Son importantes varios casos del diseño factorial general, debido a que se emplean de manera extensa en el trabajo de investigación y por qué sirven de base de otros diseños de interés práctico considerable. El más importante de estos casos especiales es el de K factores, donde cada uno tiene solo dos niveles. Estos niveles pueden ser cuantitativos tal como dos niveles de temperatura, presión, tiempo; o cualitativos tal como dos máquinas dos operadores los niveles “alto” y “bajo” de un factor o quizá la presencia o ausencia de un factor

3.8.1 Diseño 2^k para $K \geq 3$ factores(6)

Cuando $K=3$, cada factor con dos niveles se trabaja con un diseño factorial 2^3 se tienen 8 corridas o combinaciones de tratamiento geoméricamente, el diseño es un cubo, donde las 8 corridas forman las aristas del cubo.



Este diseño permite la estimación de tres efectos principales (A, B, C) junto con tres interacciones entre dos factores (AB, AC, BC) y una interacción entre tres factores (ABC). Los efectos principales pueden estimarse con facilidad y donde se sabe que las letras minúsculas a, b, ab, c, ac, bc y abc representan el total de todas las "n" replicas con ocho corridas en el diseño.

3.8.2 Técnica de Yates para el cálculo de contraste₍₆₎

Resulta laborioso elaborar la tabla de signos positivos y negativos para experimentos grandes.

Yates desarrolló una técnica tabular sistemática para derivar los efectos factoriales. Las combinaciones de tratamiento y las observaciones se deben escribir hacia abajo en forma estándar. Para un factor la forma estándar es " (1), a"; para dos factores se agrega b y ab los cuales se derivan al multiplicar con las primeras combinaciones de tratamiento por la letra adicional b, para tres factores se agregan c, ac, bc, y abc, que se derivan al multiplicar las primeras cuatro combinaciones de tratamiento por la letra adicional c y así sucesivamente en el caso de los tres factores, el orden estándar es entonces:

(1) , a, b ,ab ,c ,ac ,bc ,abc.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO.

La presente investigación tiene un tipo de estudio experimental debido a que se basa en ensayos realizados en el laboratorio equipado con material y equipo necesario para este estudio, en el que se pueden modificar las variables como temperatura, pH y tiempo de extracción.

La investigación se subdivide en tres partes:

1. Investigación bibliográfica.
2. Investigación de campo.
3. Metodología de laboratorio.

4.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Se visitaron los siguientes lugares:

- ✓ Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- ✓ Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia “Dr. Benjamin Orozco” de la Universidad de El Salvador.
- ✓ Bibliografía del Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorio Ancalmo Internacional.
- ✓ Internet

4.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO.

- ✓ Universo: Frutos cítricos

- ✓ Muestra: Toronjas (*Citrus Paradisi*), seleccionadas por limpias, sin golpes ni mordidas por roedores y fueron transportadas en contenedores plásticos a temperatura ambiente.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

La metodología de laboratorio que se siguió fue la siguiente:

La extracción de pectina, se realizó por medio de hidrólisis ácida. Se prepararon 8 lotes de 25 g de corteza seca de toronja en tres litros de agua acidulada con HCl 1N. La identificación y caracterización de la pectina obtenida para demostrar su calidad farmacéutica se determina por su contenido en ácido galacturónico que es no menos del 74.0% y por su contenido de grupos metoxilos que debe ser no menos del 6.7% con respecto a su base seca, según USP 30; así como la determinación del grado de esterificación y la formación del reograma según su viscosidad ⁽¹¹⁾.

En dicha obtención se definen tres variables principales las cuales son:

1. Tiempo de extracción.
2. Temperatura de extracción.
3. pH del medio de extracción.

A las cuales se les aplica un estudio estadístico, ya que presenta un diseño experimental 2^3 , utilizando el programa estadístico Statgraphfc para evaluar las propiedades viscosantes de la ***Citrus paradisi***.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Investigación y Tesis Profesional de los laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y en el Departamento de Control de Calidad del Laboratorio Ancalmo Internacional.

La metodología de laboratorio se divide en tres etapas:

- PROCEDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE LA PECTINA.
- CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA CRUDA.
- ANALISIS ESTADISTICO.

4.3.1 Procedimiento de la extracción de la Pectina ₍₈₎

1. Selección y limpieza de la ***Citrus paradisi***.
2. Pelado de la ***Citrus paradisi***.
3. Secado a temperatura ambiente del exocarpo de la ***Citrus paradisi***.
4. Secado en estufa Precisión Specific modelo 25 EG 65 – 210 UL OVEN a 60° hasta un peso constante.
5. Triturado en un molino de martillo Thomas Wiley Laboratory modelo 4.
6. Extracción con el agua acidulada de la pectina utilizando 25 gramos de corteza seca, y usando el diseño factorial 2^3 para las variables de pH de 1.2 y 2.6, temperatura de 40°C y 70°C; y un tiempo de 10 y 80 minutos (Ver figura N° 1 y anexo 3)
7. Reposar 30 minutos, filtrar y exprimir el residuo sólido.

8. En el filtrado precipitar, con 1.5 volúmenes de alcohol isopropílico. Filtrar, lavar y secar a 60°C en estufa Precisión Specific modelo 25 EG 65 – 210 UL OVEN.

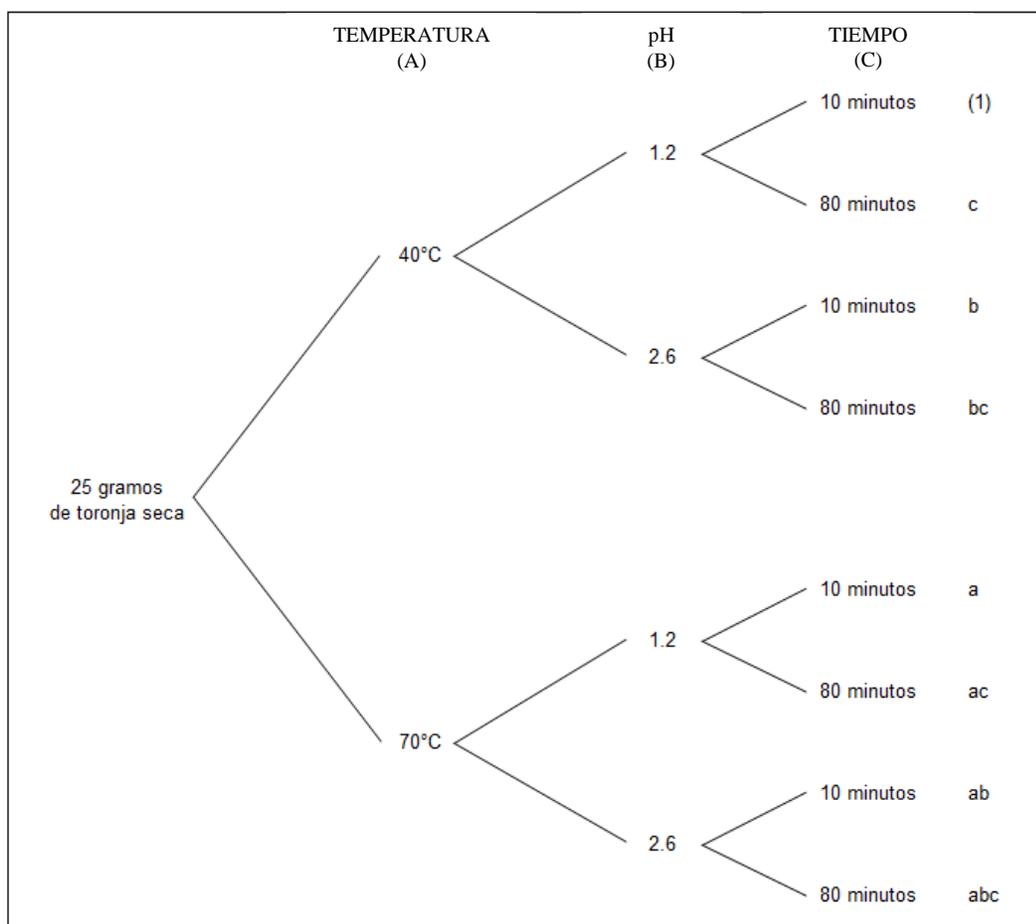


Figura N° 7 Diseño de experimento 2^3 combinaciones de variables: Diagrama de seguimiento de proceso de cada una de las combinaciones en estudio, donde **A** es Temperatura, **B** es el pH y **C** es el Tiempo de extracción.

4.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA CRUDA.

4.3.2.1 IDENTIFICACIÓN ⁽¹¹⁾

La identificación de pectina según la USP 30 se realizó siguiendo las pruebas descritas en la siguiente tabla.

TABLA N° 1 Procedimiento de identificación de pectina

Procedimiento	Resultado
Pectina +H ₂ O +baño de vapor	Gel consistente
Solución de pectina + Etanol	Precipitado gelatinoso traslúcido
Solución de pectina 1 % + NaOH 2N + reposo	Gel Consistente
Solución de Pectina + NaOH 2N + HCL 3N + Calor	Precipitado blanco ,floculento

4.3.2.2 Determinación de Grupos Metoxilos

- 1 Colocar en beaker de 250 mL, 5.0 g de pectina extraída.
- 2 Agitar por 10 minutos con una mezcla (5: 100) de ácido clorhídrico concentrado y alcohol 60 %.
- 3 Filtrar en Buchner con 6 porciones de 15 mL de la mezcla (5 : 100) de Acido Clorhídrico concentrado y alcohol 60 % .

- 4 Lavar finalmente con 20 mL de alcohol.
- 5 Secar a 105° C por 60 minutos.
- 6 Enfriar.
- 7 Pesar 250 mg de la muestra obtenida anteriormente.
- 8 Colocar en un erlemmeyer de 250 mL y humedecer con 2 mL de alcohol.
- 9 Agregar 50 mL de agua libre de CO₂.
- 10 Tapar y agitar hasta disolución completa.
- 11 Agregar 3 gotas de fenolftaleína como indicador y titular con NaOH 0.5 N VS (valoración inicial).
- 12 Agregar 10.0 mL de NaOH 0.5 N VS, agitar vigorosamente y reposar por 15 minutos.
- 13 Agregar 10.0 mL de HCL 0.5 N VS, agitar hasta que desaparezca la coloración rosada.
- 14 Agregar 2 gotas de fenolftaleína y titular con NaOH 0.5 N VS hasta que la coloración rosada débil persista después de agitar fuertemente la mezcla (Valoración final).
- 15 Cada mililitro de NaOH 0.5 N VS es equivalente a 15.52 mg de Metoxilo (OCH₃) en muestra seca.

4.3.2.3 Determinación de Ácido Galacturónico.

- 1 El volumen consumido en la valoración total de la determinación de grupos metoxilos (valoración inicial + valoración final).
- 2 Cada mililitro de NaOH 0.5 N VS es equivalente a 97.07mg. de Ácido Galacturónico (C₁₆ N₁₀ O₇).

4.3.2.4 Determinación del Grado de Esterificación.

- 1 Disolver 1 g de pectina con 100 mL de agua libre de CO₂.
- 2 Tomar una alícuota de 10.0 mL de disolución anterior.
- 3 Valorar con NaOH 0.1 N VS usando 3 gotas de fenolftaleína como indicador (valoración A).
- 4 Añadir 20.0 mL de NaOH 0.5 N VS.
- 5 Reposar por 30 min. Con el fin de desesterificar la pectina.
- 6 Añadir 20 mL de HCL 0.5 N VS o hasta neutralizar el NaOH 0.1 N VS (valoración B).
- 7 Calcular el grado de esterificación con la formula siguiente:

$$DE = \frac{B}{A + B} \times 100$$

Donde las variables son:

DE = grado de esterificación

A = volumen gastado en valoración A

B = Volumen gastado en valoración B

4.3.2.5 Determinación de la Viscosidad.

- 1 Preparar una solución de pectina al 5%,(p/v), en un beaker de 250 mL de cada una de las muestras extraídas.
- 2 Agitar por 10 minutos con agitador magnético.
- 3 Tomar la viscosidad, con el viscosímetro marca Brookfield, utilizando un Spin # 2, a 50 rpm y una temperatura de 25°C.
- 4 Anotar el valor de la viscosidad expresada en cps.
- 5 Colocar la muestra en baño maría hasta llevarla a una temperatura de 35°C dejando estabilizar la temperatura por 10 minutos.
- 6 Tomar la viscosidad utilizando las mismas condiciones que la muestra anterior.
- 7 Anotar el valor de la viscosidad expresada en cps.
- 8 Colocar nuevamente la muestra en el baño maría y llevar la muestra a 45°C, dejar estabilizar la temperatura y tomar la viscosidad utilizando las mismas condiciones.
- 9 Anotar el valor de la viscosidad expresada en cps.

- 10 Colocar nuevamente la muestra en el baño maría y llevar la muestra a 55°C, dejar estabilizar la temperatura y tomar la viscosidad utilizando las mismas condiciones.
- 11 Tomar la viscosidad utilizando las mismas condiciones que la muestra anterior.
- 12 Anotar el valor de la viscosidad expresada en cps.

4.3.3 Análisis Estadístico.

El estudio que se presenta en este trabajo de investigación se ha elaborado con el fin de experimentar los efectos de tres factores, los cuales son determinantes en la extracción de la pectina y en su caracterización.

Se clasifica como un modelo, en donde se han identificado de la siguiente manera: Temperatura (factor A), pH (factor B) y tiempo (factor C).

Para lo cual se tienen las siguientes hipótesis para cada factor en particular y para cada una de sus combinaciones.

- 1 Para probar la hipótesis que no hay diferencia debido al factor A

H_0 : No existe diferencia entre 40°C y 70°C de temperatura de extracción, para su caracterización.

H_i : La temperatura a la cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

- 2 Para probar la hipótesis que no hay diferencia debido al factor B

H_0 : No existe diferencia entre pH 1.2 y pH 2.6 de extracción, para su caracterización.

H_i : El pH al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

3. Para probar la hipótesis que no hay diferencia debido al factor C

H_0 : No existe diferencia entre 10 minutos y 80 minutos de extracción, para su caracterización.

H_i : El tiempo al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

4. Para probar la hipótesis que no hay interacción de los factores A y B

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i : La caracterización de la pectina, sí se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

5. Para probar la hipótesis que no hay interacción de los factores A y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i: La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

6. Para probar la hipótesis que no hay interacción de los factores B y C

H₀: La caracterización de la pectina, no se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i: La caracterización de la pectina, sí se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

7. Para probar la hipótesis que no hay interacción de los factores A,B y C

H₀: La caracterización de la pectina, no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i: La caracterización de la pectina, sí se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 RENDIMIENTO DE PECTINA

RENDIMIENTO DE PECTINA EN PORCENTAJE (P/ P) CON RESPECTO A CORTEZA SECA.

Ejemplo de Cálculos para la muestra de Pectina en la extracción 1:

25.0g. de corteza seca ----- 11.5193 g de Pectina

100.0g. de corteza seca ----- X

X = 46.07 % de rendimiento de Pectina

TABLA N° 2. Resultados, de rendimiento en porcentaje de obtención según planteamiento del diseño 2³

N _o Muestra	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (Minutos)	Efecto	Gramos de Pectina	Porcentaje De pectina (%)	Promedio De pectina (%)
1	40.0	1.2	10	1	11.5193	46.07	46.04
2				1	11.5001	46.00	
3			80	C	10.1097	40.44	40.84
4				C	10.3099	41.24	
5		2.6	10	B	13.0054	52.02	53.82
6				B	13.9054	55.62	
7			80	BC	13.7772	55.11	55.52
8				BC	13.9777	55.92	
9	70.0	1.2	10	A	13.5511	54.20	53.20
10				A	13.0512	52.20	
11			80	AC	15.1206	60.48	61.69
12				AC	15.7216	62.89	
13		2.6	10	AB	7.5538	30.22	31.02
14				AB	7.9519	31.81	
15			80	ABC	11.2403	44.96	46.16
16				ABC	11.8407	47.36	

En los resultados obtenidos en la tabla N° 2 se observa una tendencia a disminuir el porcentaje de pectina extraída, dando un promedio de 31.02%, al aumentar el pH 2.6, temperatura de 70°C y 10 minutos.

También se observa un incremento en el rendimiento de extracción de porcentaje de pectina a medida que se aumenta la temperatura a 70° , obteniendo así el rendimiento máximo de extracción de entre los diferentes factores, que corresponde a la pectina extraída a 70°C, pH 1.2 y tiempo de 80 minutos; dando el mayor porcentaje promedio de 61.69%.

TABLA N° 3 Análisis de varianza para el rendimiento de porcentaje (p/p) con respecto a corteza seca.

Efecto	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	P-value
A	004.25391	1	004.25391	2.12	0.1838
B	058.33140	1	058.33140	29.02	0.0007
C	101.05300	1	101.05300	50.28	0.0001
AB	905.86000	1	905.86000	450.68	0.0000
AC	183.67000	1	183.67000	91.38	0.0000
BC	046.07020	1	046.07020	22.92	0.0014
ABC	000.0105062	1	000.0105062	0.01	0.9441
ERROR TOTAL	16.0799	8	002.00998		
TOTAL	1315.330000	15			

Stargraphic en los análisis de varianza en donde se reporta el p-valor lo hace asumiendo una referencia y en este caso es el efecto 1, el que nos indica que los factores están en el valor 1 y de aquí se comparan cada efecto y sus combinaciones cuando ellos tienen un valor máximo.

Con los resultados de la tabla N° 3, se observa que los valores de p-valor del factor B (0.0007), factor C (0.0001) y las interacciones AB (0.0000), AC (0.0000) y BC (0.0014), son inferiores de 0.05; en el cual si el p-valor es mayor de 0.05 está dentro de un comportamiento normal, es decir, cuando se grafica el p-valor se tienen datos que siguen una línea recta y los anormales son resultados muy alejados de la línea recta; pero si son menores del 0.05 se sale de la

normalidad, y por ello deben ser objeto de más estudio y así determinar a qué se deben esas interacciones y su efecto en las propiedades físico-químicas de la pectina estudiada

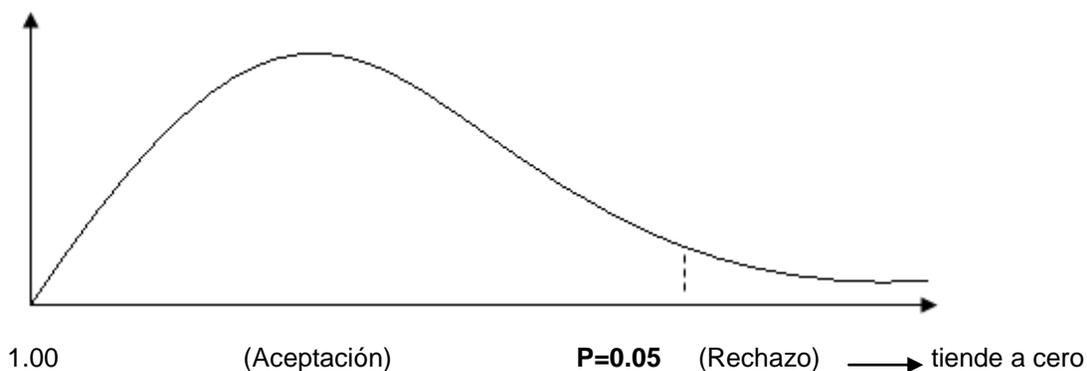


Figura N° 8 Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis.

Con la ayuda de la figura N° 8 se pueden analizar las hipótesis:

1. Que no hay diferencia debido al factor A

H_0 : No existe diferencia entre 40°C y 70°C de temperatura de extracción, para su caracterización.

H_i : La temperatura a la cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor A dió como resultado 0.1838, siendo un valor mayor a $P= 0.05$, indicando que la temperatura, está dentro del rango de aceptación pudiendo afirmar que es un factor que no influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula.

2. Que no hay diferencia debido al factor B

H_0 : No existe diferencia entre pH 1.2 y pH 2.6 de extracción, para su caracterización.

H_i : El pH al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor de factor B dió como resultado 0.0007, siendo un valor menor a $P=0.05$ indicando que el valor de pH está dentro del rango de rechazo pudiendo decir que es un factor que sí influye, lo que nos lleva a aceptar la hipótesis alternativa.

3. Que no hay diferencia debido al factor C

H_0 : No existe diferencia entre 10 minutos y 80 minutos de extracción, para su caracterización.

H_i : El tiempo al cual se extrajo la pectina, sí interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor C dió como resultado 0.0001 siendo un valor menor a $P=0.05$, e indica que el tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

4. Que no hay interacción de los factores A y B

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_i: La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores A y B dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - pH de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

5. Que no hay interacción de los factores A y C

H₀: La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_i: La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción A y C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

6. Que no hay interacción de los factores B y C

H₀: La caracterización de la pectina no se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i: La caracterización de la pectina si se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores B y C dió como resultado 0.0014 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción pH – tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

7. Que no hay interacción de los factores A,B y C

H₀: La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i: La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los tres factores dió como resultado 0.9441, siendo un valor mayor a $P=0.05$, lo que indica que está dentro del rango de aceptación pudiendo afirmar que es un factor que no influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula, la cual indica que las variaciones de los factores a las cuales fue extraída la Pectina, temperatura de 70°C y 40°C; pH de 2.6 y 1.2; y los tiempos de 10 y 80 minutos no afectan en el porcentaje de rendimiento obtenido de la pectina.

Para identificar las condiciones de trabajo ver la figura N° 7

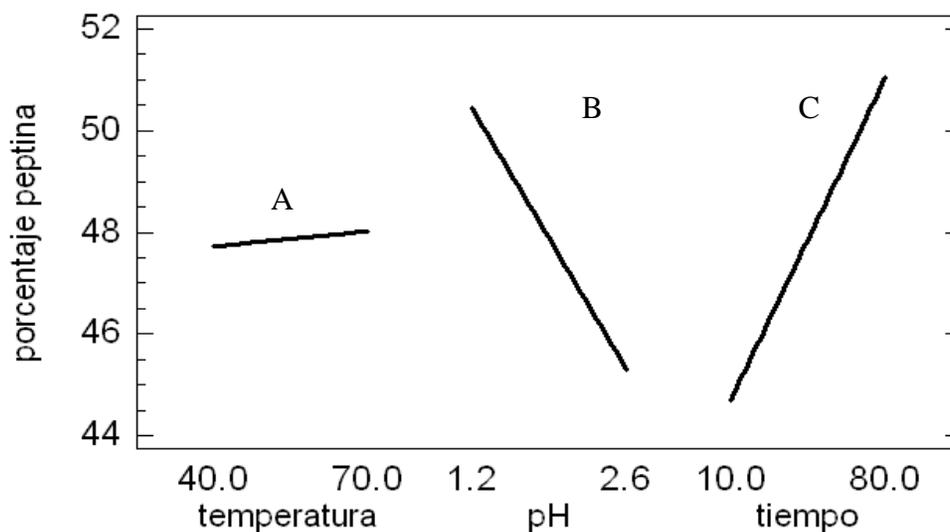


Figura N° 9 Gráfico de efectos principales para porcentaje promedio de pectina.

Donde: A = Temperatura

B = pH

C = Tiempo

En los gráficos de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

La figura N° 9 nos demuestra el efecto de temperatura (A) que da un mayor porcentaje de pectina cuando su valor es de 70°C; el efecto del pH (B) da el mayor porcentaje de pectina cuando su valor es de 1.2, el efecto del tiempo (C) da un mayor porcentaje de pectina cuando es de 80 minutos, lo que indica que para obtener un mayor porcentaje de pectina se debe trabajar con los valores

máximos de temperatura y tiempo, mínimo pH que se muestran en el diseño de experimentos tiempo 2^3 (Ver figura N° 7).

Para identificar las condiciones de trabajo ver figura N° 7

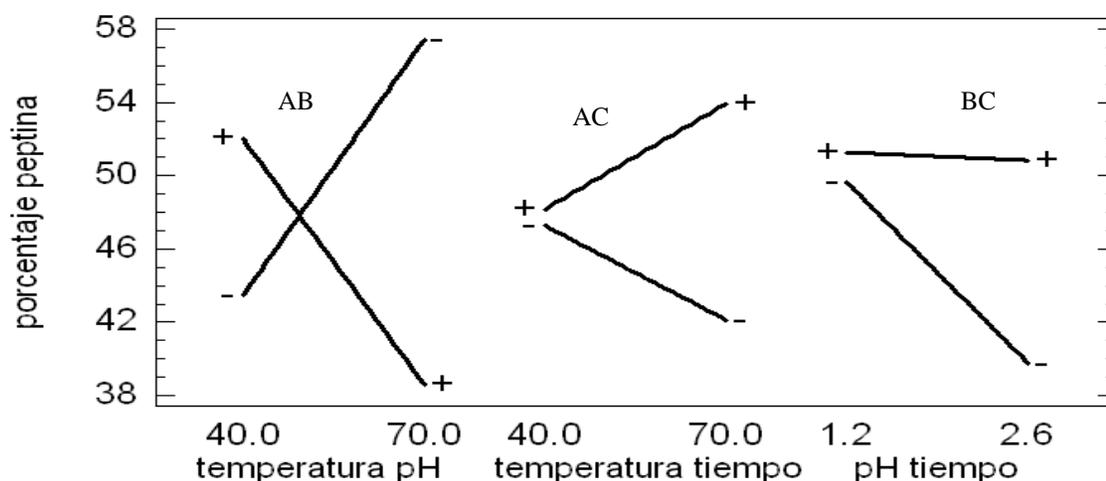


FIGURA N°10 Gráfico de la interacción para porcentaje promedio de pectina.

Nota: El signo (-) representa los valores mínimos trabajados

El signo (+) representa los valores máximos trabajados

En los gráficos de interacción de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

En la figura N° 10 la interacción temperatura-pH (AB), indica que se obtiene un mayor porcentaje de pectina cuando la temperatura está en su nivel máximo y el pH en su valor mínimo (AB^+); en cuanto a la interacción temperatura-tiempo (AC) nos indica que el mayor resultado se obtiene cuando la temperatura y el tiempo están en su valor máximo (AC^+). Con la interacción pH – tiempo (BC) el mayor

porcentaje se obtiene cuando el pH se encuentra en su valor mínimo y el tiempo en su valor máximo (BC⁺).

TABLA N°4 Coeficiente de regresión para porcentaje de Pectina

Efecto	Coeficiente	Valor
A	β_1	00.133034
B	β_2	-15.262900
C	β_3	-00.508384
AB	β_4	-00.0559014
AC	β_5	-00.00168197
BC	β_6	00.292126
ABC	β_7	00.000363946

$$\beta_0 = 75.5488$$

ECUACIÓN DEL MODELO AJUSTADO

$$\% \text{ DE PECTINA} = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2y + \beta_3z + \beta_4xy + \beta_5xz + \beta_6yz + \beta_7xy.$$

Donde:

$$\beta_0 = 75.5488$$

X = Temperatura en °C

Y = pH

Z = Tiempo en minutos

La ecuación anterior es una herramienta que nos predice el resultado teórico del rendimiento de pectina en función del tiempo, temperatura y pH, siendo válida en el rango de trabajo para cada uno de los valores máximos y mínimos que se muestran en la figura N° 7.

Por ejemplo, para conocer resultados teóricos de rendimiento de pectina usando puntos intermedios (pH: 1.9; temperatura: 55°C; tiempo: 45 minutos) la ecuación nos permite conocer ese dato teórico esperado.

TABLA N°5 Respuesta optimizada

FACTOR	MENOR	MAYOR	OPTIMO
Temperatura	40.0	70.0	70.0
pH	1.2	2.6	1.2
Tiempo	10.0	80.0	10.0

Objetivo: Maximizar porcentaje Pectina

Valor óptimo: 59.4%: Este es el valor ideal esperado del porcentaje de rendimiento de Pectina al aplicar al diseño experimental la ecuación del modelo ajustado.

RESUMEN DEL DISEÑO

Nombre del diseño: FACTORIAL

Base del diseño

Números de factores experimentales: 3, números de bloques: 2

Números de residuos: 1

Números de repeticiones: 16

Error de grado de libertad: 8

TABLA N°6 Resumen de condiciones de trabajo.

FACTORES	MENOR	MAYOR	UNIDADES	CONTINUO
Temperatura	40.0	70.0	Grados °C	Si
pH	1.2	2.6	-----	Si
Tiempo	10.0	80.0	Minutos	Si

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA CRUDA₍₁₁₎

TABLA N° 7 Resultados de la identificación

Determinación	Especificación	Resultado
Pectina +H ₂ O +baño de vapor	Gel consistente	Conforme
Solución de pectina + Etanol	Precipitado gelatinoso Traslúcido	Conforme
Solución de pectina 1 % + NaOH 2N + reposo	Gel Consistente	Conforme
Solución de Pectina + NaOH 2N + HCL 3N + Calor	Precipitado blanco y floculento	Conforme

Con los resultados obtenidos en la caracterización de la muestra se determinó que la pectina extraída de la variedad *Citrus paradisi* cumple las pruebas oficiales de identificación, especificadas en monografía conforme a USP 30.

(ver anexo N°1).

5.3 PORCENTAJE DE GRUPOS METOXILO EN MUESTRA₍₁₁₎

Especificación: (-OCH₃) no menor de 6.7 %

Ejemplo de cálculos para el porcentaje de metoxilo en la muestra de extracción1:

$$\% = \frac{\text{volumen gastado de NaOH} \times \text{Eq.Metoxilo} \times 100}{\text{Peso de muestra}}$$

$$\% = \frac{(0.43\text{mL}) (15.52\text{mg/mL}) (100)}{250.0\text{mg}} = 2.65\% \text{ de Metoxilo}$$

Nota: En todas las lecturas de metoxilo se realizó con base en el procedimiento descrito en numeral 2.3.2.2

TABLA N° 8 Resultados obtenidos del porcentaje de Grupos Metoxilo según planteamiento del diseño 2³

N ^o Muestra	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (Minutos)	Efecto	Volumen de Saponificación (mL)	Porcentaje (%)
1	40.0	1.2	10	1	0.43	2.65
2				1	0.43	2.65
3			80	C	0.33	2.05
4				C	0.33	2.05
5		2.6	10	B	0.91	5.64
6				B	0.81	5.04
7			80	BC	1.13	7.00
8				BC	1.13	7.00
9	70.0	1.2	10	A	1.75	10.85
10				A	1.75	10.85
11			80	AC	1.62	10.04
12				AC	1.62	10.04
13		2.6	10	AB	1.60	9.90
14				AB	1.60	9.90
15			80	ABC	1.37	8.50
16				ABC	1.37	8.50

Según los resultados de tabla N°8 se observa que en general las condiciones en las que no se obtienen una pectina de calidad USP según la especificación de metoxilo son: temperatura de 40°C ; pH 1.2 con un tiempo de 10 y 80 minutos y con pH de 2.6 con 10 minutos.

Todas las demás condiciones planteadas en este diseño de experimento permiten obtener pectinas con grado de metoxilo aceptadas por la USP 30

TABLA N°9 Análisis de la varianza para el porcentaje de metoxilo.

Efecto	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	P value
A	123.543000	1	123.543000	5307.98	0.0000
B	006.943220	1	006.943220	298.31	0.0000
C	000.313600	1	000.313600	13.47	0.0063
AB	025.300900	1	025.300900	1087.04	0.0000
AC	002.706020	1	002.706020	116.26	0.0000
BC	000.714025	1	000.714025	30.68	0.0005
ABC	002.073600	1	002.073600	89.09	0.0000
ERROR TOTAL	000.186200	8	000.023275		
TOTAL	161.781000	15			

Stargraphic en los análisis de varianza en donde se reporta el p-valor lo hace asumiendo una referencia y en este caso es el efecto 1, el que nos indica que los factores están en el valor 1 y de aquí se comparan cada efecto y sus combinaciones cuando ellos tienen un valor máximo.

Con los resultados de la tabla N° 9, se observa que los valores de p-valor del factor A (0.0000), factor B (0.0000), factor C (0.0063) y las interacciones AB (0.0000), AC (0.0000) y BC (0.0005), son inferiores de 0.05 en el cual si el p-valor es mayor de 0.05 está dentro de un comportamiento normal, es decir, cuando se grafica el p-valor se tienen datos que siguen una línea recta y los anormales son resultados muy alejados de la línea recta; pero si son menores del 0.05 se sale de la normalidad, y por ello deben ser objeto de más estudio y así determinar a qué se deben esas interacciones y su efecto en las propiedades físico-químicas de la pectina estudiada.

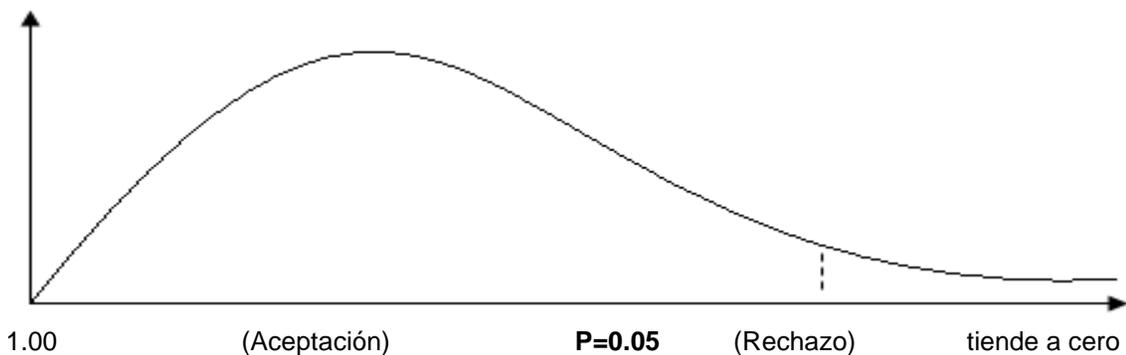


Figura N° 11 Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis.

Con la ayuda de la figura N° 11 se puede analizar las hipótesis:

1. Que no hay diferencia debido al factor A

H_0 : No existe diferencia entre 40°C y 70°C de temperatura de extracción, para su caracterización.

H_i : La temperatura a la cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor A dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a $P= 0.05$, indicando que la temperatura, está dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es un factor que si influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

2. Que no hay diferencia debido al factor B

H_0 : No existe diferencia entre pH 1.2 y pH 2.6 de extracción, para su caracterización.

H_i : El pH al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor de factor B dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a $P=0.05$ indicando que el valor de pH está dentro del rango de rechazo pudiendo decir que es un factor que sí influye, lo que nos lleva a aceptar la hipótesis alternativa.

3. Que no hay diferencia debido al factor C

H_0 : No existe diferencia entre 10 minutos y 80 minutos de extracción, para su caracterización.

H_i : El tiempo al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor C dió como resultado 0.0063 siendo un valor menor a $P=0.05$, e indica que el tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

4. Que no hay interacción de los factores A y B

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores A y B dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - pH de

extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

5. Que no hay interacción de los factores A y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción A y C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

6. Que no hay interacción de los factores B y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores B y C dió como resultado 0.0005 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción pH – tiempo de

extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

7. Que no hay interacción de los factores A, B y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los tres factores dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, lo que indica que está dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, la cual indica que las variaciones de los factores a las cuales fue extraída la Pectina, temperatura de 70°C y 40°C; pH de 2.6 y 1.2; y los tiempos de 10 y 80 minutos si afectan en el porcentaje de metoxilo de la pectina obtenida.

TABLA N°10 Coeficiente de regresión para porcentaje de Metoxilo

Efecto	Coeficiente	Valor
A	β_1	0.36670100
B	β_2	4.76973000
C	β_3	-0.07877550
AB	β_4	-0.07697280
AC	β_5	0.00106327
BC	β_6	0.06183670
ABC	β_7	-0.000969388

ECUACIÓN MODELO AJUSTADO

$$\% \text{ METOXILO} = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2y + \beta_3z + \beta_4xy + \beta_5xz + \beta_6yz + \beta_7xyz.$$

Donde:

$$\beta_0 = -13.9613$$

X = Temperatura en °C

Y = pH

Z = Tiempo en minutos

TABLA N° 11 Respuesta optimizada

FACTOR	MENOR	MAYOR	OPTIMO
Temperatura	40.0	70.0	70.0
pH	1.2	2.6	1.2
Tiempo	10.0	80.0	10.0

Objetivo: Maximizar porcentaje Metoxilo

Valor óptimo: 10.85% éste es el valor ideal de Metoxilo esperado al aplicar al diseño experimental la ecuación del modelo ajustado.

RESUMEN DEL DISEÑO

Nombre del diseño: FACTORIAL

Base del diseño

Números de factores experimentales: 3, números de bloques: 2

Números de residuos: 1

Números de repeticiones: 16

Error de grado de libertad: 8

Para identificar las condiciones de trabajo ver la figura N° 7

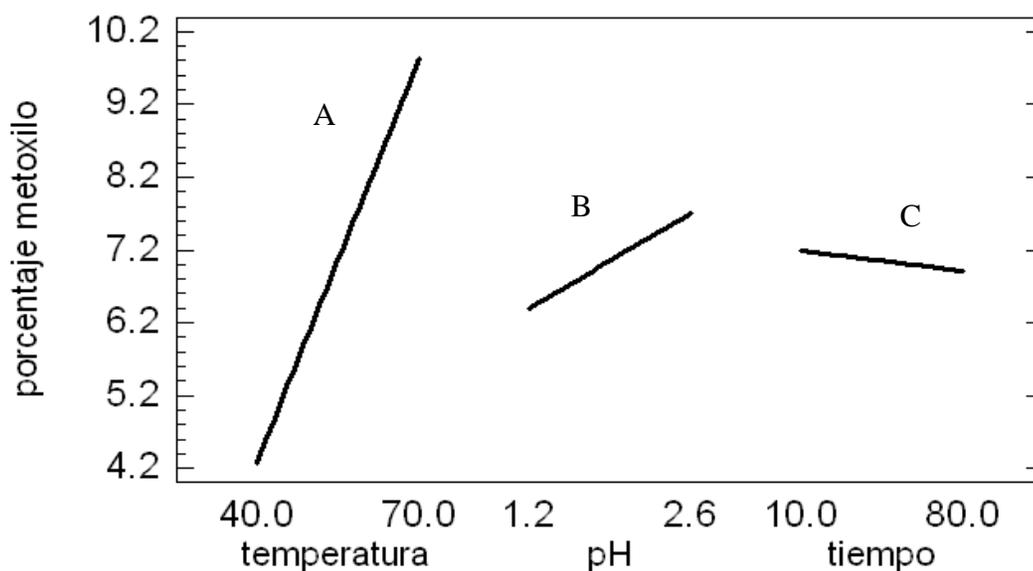


Figura N° 12 Gráfico de efectos principales para porcentaje metoxilo.

En los gráficos de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa Stargraphic plotea valores promedios.

La figura N° 12 demuestra que el efecto de temperatura da un mayor porcentaje de metoxilo cuando su valor es de 70°C; el efecto del pH da el mayor porcentaje de metoxilo cuando su valor es de 2.6; y el efecto del tiempo da un mayor porcentaje de metoxilo cuando es de 10 minutos esto indica que para obtener un mayor porcentaje de metoxilo se debe trabajar con los valores máximos de temperatura y pH y el valor mínimo de tiempo que se muestran en el diseño de experimentos 2^3 (Ver figura N° 7).

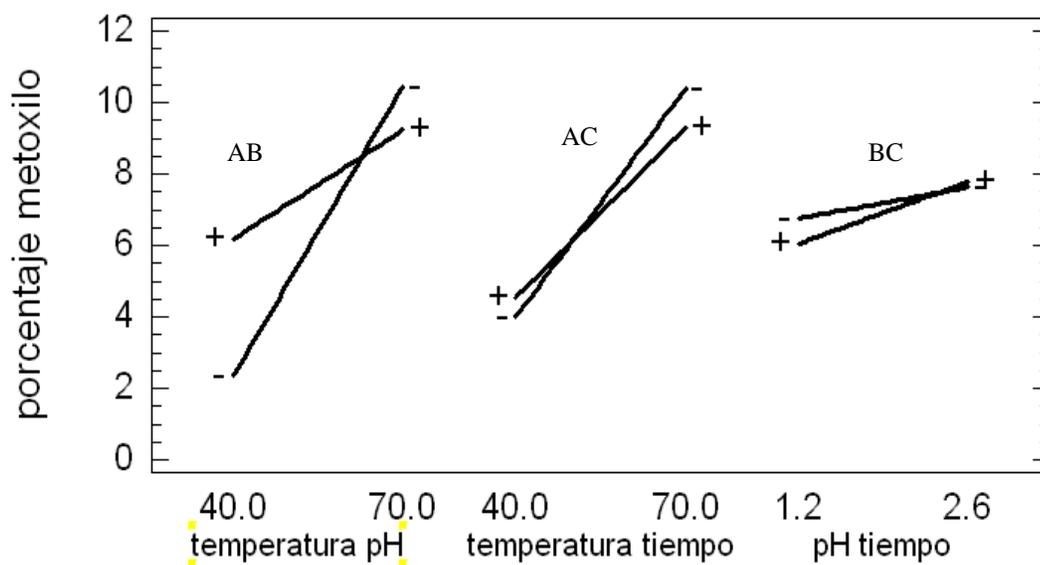


Figura N°13 Gráfico de la interacción para porcentaje de metoxilo

Nota: El signo (-) representa los valores mínimos trabajados

El signo (+) representa los valores máximos trabajados

En los gráficos de interacción de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

La figura número N° 13 la interacción temperatura- pH (AB) demuestra un mayor porcentaje de Metoxilo cuando la temperatura es máxima y pH mínimo (AB^-); la interacción temperatura-tiempo (AC) da un mayor porcentaje en temperatura máxima y tiempo mínimo (AC^-); en cuanto a la interacción pH- tiempo (BC) el mayor porcentaje de Metoxilo se obtiene cuando el pH esta en su máximo valor y el tiempo puede ser máximo (BC^+). o mínimo (BC^-) ya que la diferencia entre ellos es mínima .

5.4 RESULTADOS DE PORCENTAJE DE ÁCIDO GALACTURÓNICO

Especificación: $C_6 H_{10} O_7$ no menor del 74%

Ejemplo de cálculos para encontrar el porcentaje del ácido galacturónico en la muestra 1:

Volumen Inicial + Volumen de Saponificación = Volumen Total gastado de NaOH.

$$\% = \frac{\text{Volumen total gastado de NaOH} \times \text{Eq.Ácido Galacturónico} \times 100}{\text{Peso total de muestra}}$$

$$\% = \frac{(0.53 + 1.75) (97.07) (100)}{250.0} = 88.6\% \text{ de Ácido Galacturónico}$$

Tabla N° 12 Resultados obtenidos del porcentaje de Ácido Galacturónico según planteamiento del diseño 2³.

N° Muestra	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (Minuto)	Efecto	Volumen Inicial (mL)	Volumen de Saponificación (mL)	Porcentaje (%)
1	40.0	1.2	10	1	0.53	1.75	88.60
2				1	0.45	1.80	87.00
3			80	C	0.74	1.47	85.95
4				C	0.74	1.47	85.95
5		2.6	10	B	0.85	0.80	64.01
6				B	0.85	0.80	64.01
7			80	BC	0.63	1.00	64.01
8				BC	0.63	1.00	64.01
9	70.0	1.2	10	A	1.06	0.95	78.01
10				A	1.06	0.95	78.01
11			80	AC	0.53	1.74	89.00
12				AC	0.53	1.74	89.00
13		2.6	10	AB	0.95	1.43	93.01
14				AB	0.95	1.43	93.01
15			80	ABC	0.72	1.60	90.05
16				ABC	0.72	1.60	90.05

Para obtener una pectina calidad USP (mayor de 74%) con respecto al Ácido Galacturónico no se debe de extraer a temperatura de 40°C, y pH de 2.6 pues estas condiciones no lo permiten, ya que reporta 64.01% por lo que no cumple con lo especificado⁽¹¹⁾

TABLA N° 13 Análisis de la varianza para el porcentaje de ácido Galacturónico

Efecto	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	P-value
A	576.96	1	576.96	3027.47	0.0000
B	214.623	1	214.623	1126.18	0.0000
C	10.4006	1	10.4006	54.57	0.0001
AB	941.569	1	941.569	4940.68	0.0000
AC	22.8484	1	22.8484	119.89	0.0000
BC	34.5744	1	34.5744	181.42	0.0000
ABC	65.2056	1	65.2056	342.15	0.0000
ERROR TOTAL	1.5246	8			
TOTAL	1867.71	15	0.190575		

Stargraphic en los análisis de varianza en donde se reporta el p-valor lo hace asumiendo una referencia y en este caso es el efecto 1, el que nos indica que los factores están en el valor 1 y de aquí se comparan cada efecto y sus combinaciones cuando ellos tienen un valor máximo.

Con los resultados de la tabla N° 13, se observa que los valores de p-valor del factor A (0.0000), factor B (0.0000), factor C (0.0001) y las interacciones AB (0.0000), AC (0.0000) y BC (0.0000), son inferiores de 0.05 en el cual si el p-valor es mayor de 0.05 está dentro de un comportamiento normal, es decir, cuando se grafica el p-valor se tienen datos que siguen una línea recta y los anormales son resultados muy alejados de la línea recta; pero si son menores del 0.05 se sale de la normalidad, y por ello deben ser objeto de más estudio y así determinar a qué se deben esas interacciones y su efecto en las propiedades físico-químicas de la pectina estudiada.

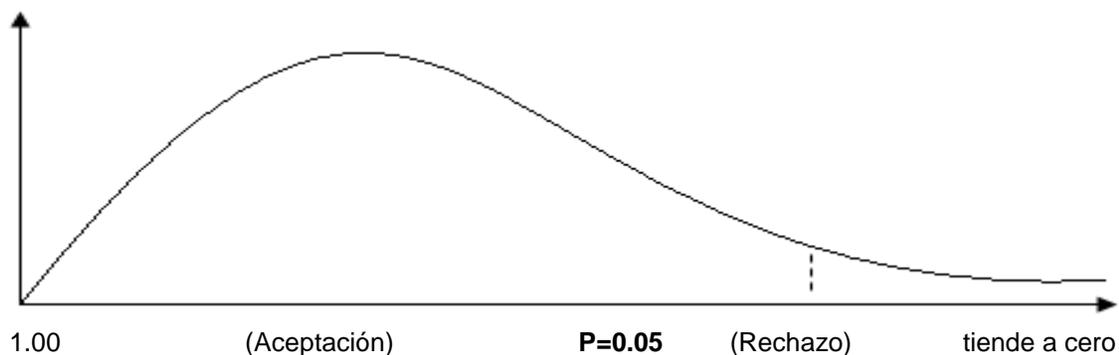


Figura N° 14 Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis.

Con la ayuda de la figura N° 14 se puede analizar las hipótesis:

1. Que no hay diferencia debido al factor A

H_0 : No existe diferencia entre 40°C y 70°C de temperatura de extracción, para su caracterización.

H_i : La temperatura a la cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor A dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a

$P= 0.05$, indicando que la temperatura, está dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

2. Que no hay diferencia debido al factor B

H_0 : No existe diferencia entre pH 1.2 y pH 2.6 de extracción, para su caracterización.

H_i : El pH al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor de factor B dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a $P=0.05$ indicando que el valor de pH está dentro del rango de rechazo pudiendo decir que es un factor que sí influye, lo que nos lleva a aceptar la hipótesis alternativa.

3. Que no hay diferencia debido al factor C

H_0 : No existe diferencia entre 10 minutos y 80 minutos de extracción, para su caracterización.

H_i : El tiempo al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor C dió como resultado 0.0001 siendo un valor menor a $P=0.05$, e indica que el tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

4. Que no hay interacción de los factores A y B

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores A y B dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - pH de

extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

5. Que no hay interacción de los factores A y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_1 : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción A y C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

6. Que no hay interacción de los factores B y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_1 : La caracterización de la pectina si se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores B y C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción pH – tiempo de

extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

7. Que no hay interacción de los factores A,B y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los tres factores dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, lo que indica que está dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, la cual indica que las variaciones de los factores a las cuales fue extraída la Pectina, temperatura de 70°C y 40°C; pH de 2.6 y 1.2; y los tiempos de 10 y 80 minutos si afectan en el porcentaje de ácido galacturónico de la pectina obtenida.

TABLA N°14 Coeficiente de regresión para porcentaje de ácido galacturónico.

Constante	Coeficiente	Valor
A	β_1	-1.56025000
B	β_2	-56.27410000
C	β_3	-0.55161200
AB	β_4	0.97731300
AC	β_5	0.01256330
BC	β_6	0.23384400
ABC	β_7	-0.00537415

ECUACIÓN DEL MODELO AJUSTADO.

$$\% \text{ GALACTURÓNICO} = \beta_0 + \beta_y X + \beta_z Y + \beta_3 Z + \beta_4 XY + \beta_5 XZ + \beta_6 YZ + \beta_7 XYZ.$$

Donde:

$$\beta_0 = 171.092$$

X = Temperatura en °C

Y = pH

Z = Tiempo en minutos.

TABLA N°15 Respuesta optimizada.

FACTOR	MENOR	MAYOR	OPTIMO
Temperatura	40.0	70.0	70.0
pH	1.2	2.6	2.6
Tiempo	10.0	80.0	10.0

Objetivo: Maximizar porcentaje de Ácido Galacturónico.

Valor óptimo: 93.01% Este es el valor ideal de Ácido Galacturónico esperado al aplicar al diseño experimental la ecuación del modelo ajustado.

RESUMEN DEL DISEÑO

Nombre del diseño: FACTORIAL

Base del diseño

Números de factores experimentales: 3, números de bloques: 2

Números de residuos: 1

Números de repeticiones: 16

Error de grado de libertad: 8

Para identificar las condiciones de trabajo ver la tabla N° 6 y el grafico N° 1

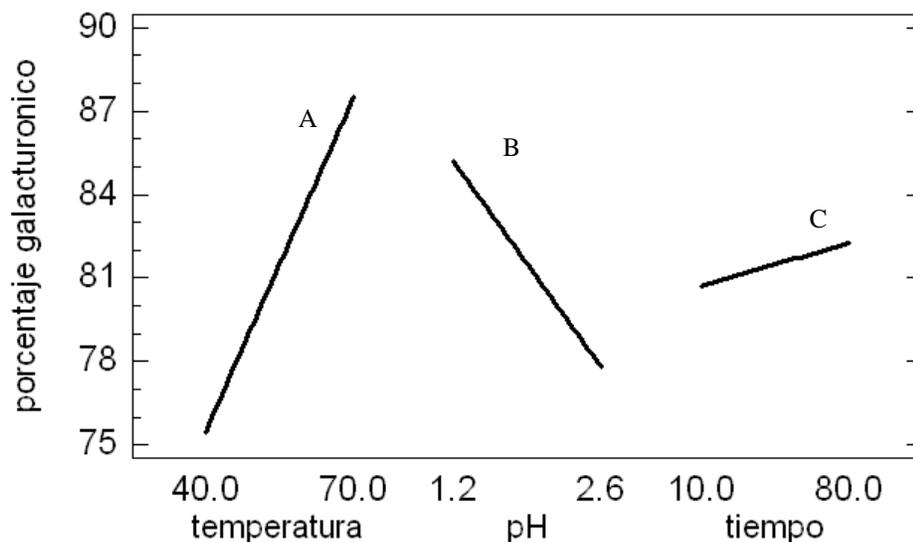


FIGURA N° 15 Gráfico de efectos principales para porcentaje galacturónico.

En los gráficos de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

La figura N° 15 demuestra que el efecto de temperatura da un mayor porcentaje de ácido galacturónico cuando su valor es de 70°C; el efecto del pH da el mayor porcentaje de ácido galacturónico cuando su valor es de 1.2; y el efecto del tiempo nos da un mayor porcentaje de ácido galacturónico cuando es de 80 minutos. Lo que nos indica que para obtener un mayor porcentaje de ácido galacturónico se debe trabajar con los valores máximos de temperatura y tiempo y el valor mínimo de pH que se muestra en el diseño de experimentos 2^3

(Ver figura N° 7)

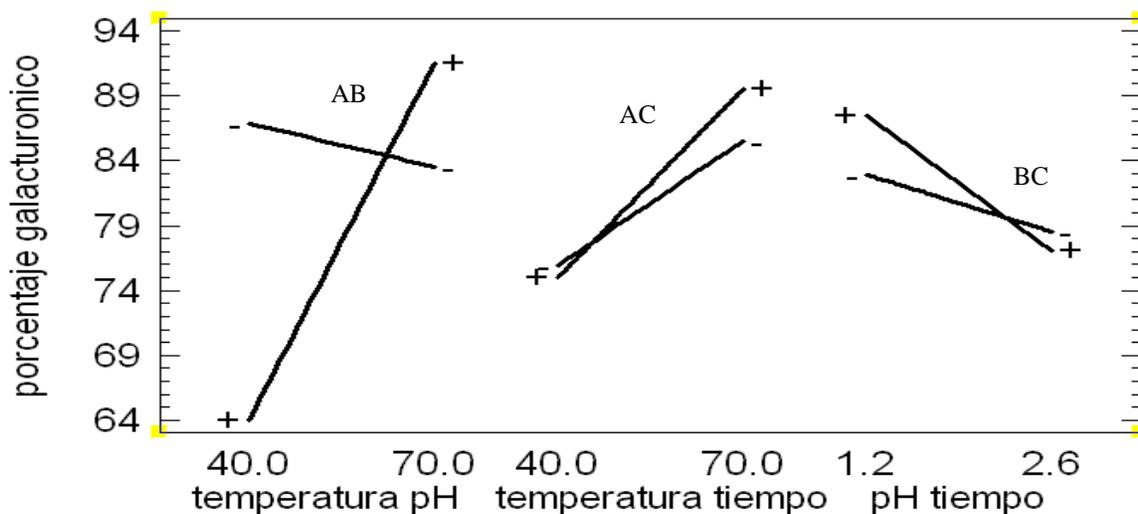


FIGURA N° 16 Gráfico de la interacción para porcentaje del ácido galacturónico

Nota: El signo (-) representa los valores mínimos trabajados.

El signo (+) representa los valores máximos trabajados.

En los gráficos de interacción de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

En la figura número N° 16 la interacción temperatura- pH (AB) demuestra un mayor porcentaje de ácido galacturónico cuando la temperatura y pH están en sus valores máximos (AB⁺); la interacción temperatura-tiempo (AC) da un mayor porcentaje de ácido galacturónico en temperatura máxima y tiempo máximo (AC⁺); en cuanto a la interacción pH- tiempo (BC) el mayor porcentaje de ácido galacturónico se obtiene cuando el pH está en su mínimo valor y el tiempo en su máximo valor (BC⁺).

5.5 PORCENTAJE DEL GRADO DE ESTERIFICACIÓN.

Ejemplo de Cálculos para encontrar el grado de esterificación en la muestra 1:

$$DE = \frac{B}{A + B} \times 100 = \frac{15.4}{2.1 + 15.4} \times 100 = 88.0 \% \text{ de grado de esterificación.}$$

TABLA N° 16 Resultados obtenidos de la valoración para el grado de esterificación según planteamiento del diseño 2³.

N° Muestra	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (Minutos)	Efecto	Valoración A (ml)	Valoración B (ml)	Porcentaje (%)
1	40.0	1.2	10	1	2.10	15.40	88.0
2				1	2.10	15.40	88.0
3			80	C	2.05	13.14	86.5
4				C	2.05	13.14	86.5
5		2.6	10	B	1.00	4.56	82.0
6				B	1.00	4.56	82.0
7			80	BC	1.10	5.78	84.0
8				BC	1.10	5.78	84.0
9	70.0	1.2	10	A	1.20	0.40	25.0
10				A	1.20	0.40	25.0
11			80	AC	2.20	24.00	91.6
12				AC	2.20	24.00	91.6
13		2.6	10	AB	1.50	13.30	89.9
14				AB	1.50	13.30	89.9
15			80	ABC	2.70	14.80	84.6
16				ABC	2.70	14.80	84.6

Según la tabla N° 16 de resultados de grado de esterificación para obtener un alto porcentaje de él se debe trabajar con temperatura de 40°C, pH de 1.2 con un tiempo de 10 u 80 minutos; si se trabaja a 70°C se debe trabajar a pH de, 2.6 con un tiempo de 10 u 80 minutos; o 70°C a pH de, 1.2 con un tiempo de 80 minutos así se puede obtener una pectina de alto grado de esterificación; sin embargo para obtener un porcentaje bajo de esterificación se debe extraer a una temperatura de 40°C, pH de 2.6 con un tiempo de 10 a 80 minutos o 70°C, pH

de 1.2 y un tiempo de 10 minutos y así poder clasificarla como pectina de bajo grado de esterificación.

TABLA N° 17 Análisis de la varianza para el porcentaje del grado de esterificación.

Efecto	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	P-Value
A	619.388	1	619.388	10064.18	0.0000
B	616.901	1	616.901	10023.79	0.0000
C	926.137	1	926.137	15048.43	0.0000
AB	1092.8	1	1092.8	17756.45	0.0000
AC	912.795	1	912.795	14831.65	0.0000
BC	1160.25	1	1160.25	18852.51	0.0000
ABC	1431.3	1	1431.3	23256.59	0.0000
ERROR TOTAL	0.49235	8	0.0615438		
TOTAL	6760.06	15			

Stargraphic en los análisis de varianza en donde se reporta el p-valor lo hace asumiendo una referencia y en este caso es el efecto 1, el que nos indica que los factores están en el valor 1 y de aquí se comparan cada efecto y sus combinaciones cuando ellos tienen un valor máximo.

Con los resultados de la tabla N° 19, se observa que los valores de p-valor del factor A (0.0000), factor B (0.0000), factor C (0.0000) y las interacciones AB (0.0000), AC (0.0000) y BC (0.0000), son inferiores de 0.05 en el cual si el p-valor es mayor de 0.05 está dentro de un comportamiento normal, es decir, cuando se grafica el p-valor se tienen datos que siguen una línea recta y los anormales son resultados muy alejados de la línea recta; pero si son menores del 0.05 se sale de la normalidad, y por ello deben ser objeto de más estudio y así determinar a qué se deben esas interacciones y su efecto en las propiedades físico-químicas de la pectina estudiada.

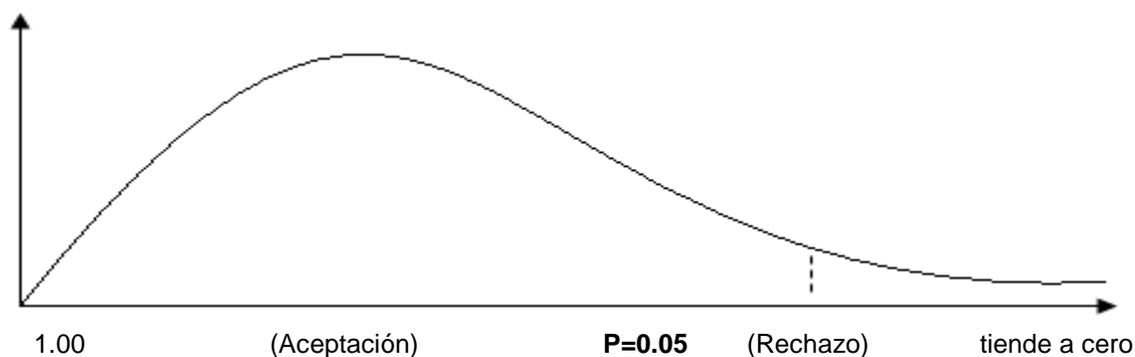


Figura N°17 Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis

Con la ayuda de la figura N° 17 se puede analizar las hipótesis:

1. Que no hay diferencia debido al factor A

H_0 : No existe diferencia entre 40°C y 70°C de temperatura de extracción, para su caracterización.

H_i : La temperatura a la cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor A dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a

$P= 0.05$, indicando que la temperatura, está dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

2. Que no hay diferencia debido al factor B

H_0 : No existe diferencia entre pH 1.2 y pH 2.6 de extracción, para su caracterización.

H_i : El pH al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor de factor B dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a $P=0.05$ indicando que el valor de pH está dentro del rango de rechazo pudiendo decir que es un factor que sí influye, lo que nos lleva a aceptar la hipótesis alternativa.

3. Que no hay diferencia debido al factor C

H_0 : No existe diferencia entre 10 minutos y 80 minutos de extracción, para su caracterización.

H_i : El tiempo al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, e indica que el tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

4. Que no hay interacción de los factores A y B

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores A y B dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - pH de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

5. Que no hay interacción de los factores A y C

H_o : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción A y C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

6. Que no hay interacción de los factores B y C

H_o : La caracterización de la pectina no se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores B y C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción pH – tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

7. Que no hay interacción de los factores A,B y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_i : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los tres factores dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, lo que indica que está dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es una interacción que sí influye. Por tanto se acepta la hipótesis alternativa, la cual indica que las variaciones de los factores a las cuales fue extraída la Pectina, temperatura de 70°C y 40°C; pH de 2.6 y 1.2; y los tiempos de 10 y 80 minutos si afectan en el porcentaje del grado de esterificación la pectina obtenida.

TABLA N° 18 Coeficiente de regresión para porcentaje de esterificación

Efecto	Coeficiente	Valor
A	β_1	-4.75776
B	β_2	-82.42520
C	β_3	-2.59245
AB	β_4	1.94456
AC	β_5	0.0632041
BC	β_6	1.06156
ABC	β_7	-0.0256463

ECUACIÓN MODELO AJUSTADO

$$\% \text{ ESTERIFICACIÓN} = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 Y + \beta_3 Z + \beta_4 XY + \beta_5 XZ + \beta_6 YZ + \beta_7 XYZ.$$

Donde:

$$\beta_0 = 284.096$$

X = Temperatura en °C

Y = pH

Z = Tiempo en minutos

TABLA N° 19 Respuesta optimizada

FACTOR	MENOR	MAYOR	OPTIMO
Temperatura	40.0	70.0	70.0
pH	1.2	2.6	1.2
Tiempo	10.0	80.0	80.0

Objetivo: Maximizar porcentaje Esterificación

Valor óptimo: 91.6% Este es el valor ideal esperado del porcentaje de esterificación al aplicar al diseño experimental la ecuación del modelo ajustado

RESUMEN DEL DISEÑO

Nombre del diseño: FACTORIAL

Base del diseño

Números de factores experimentales: 3, números de bloques: 2

Números de residuos: 1

Números de repeticiones: 16

Error de grado de libertad: 8

Para identificar las condiciones de trabajo ver la figura N° 7

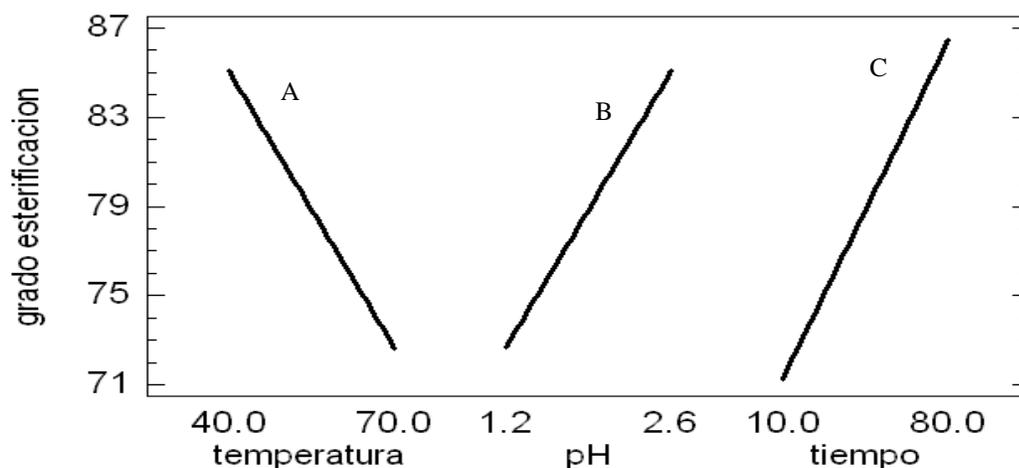


FIGURA N° 18 Gráfico de efectos principales para grado esterificación.

En los gráficos de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

La figura N° 18 demuestra que el efecto de temperatura da un mayor grado de esterificación cuando su valor es de 40°C; el efecto del pH da el mayor grado de esterificación cuando su valor es de 2.6; y el efecto del tiempo da un mayor grado de esterificación cuando es de 80 minutos lo que indica que para obtener una pectina con alto grado de esterificación se debe trabajar con los valores

mínimos de temperatura y pH; y con un tiempo máximo como se muestran en el diseño de experimentos 2^3 (Ver figura N° 7)

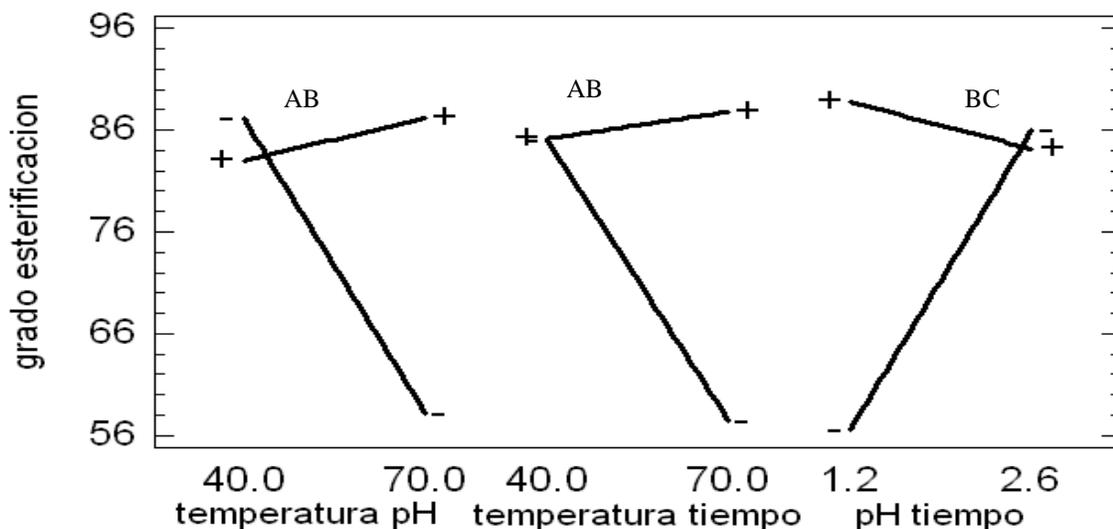


FIGURA N° 19 Gráfico de la interacción para grado esterificación.

Nota: El signo (-) representa los valores mínimos trabajados.

El signo (+) representa los valores máximos trabajados.

En los gráficos de interacción de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

La gráfica anterior demuestra las interacciones entre los efectos y así determinar que la interacción temperatura - pH (AB) da un mayor grado de esterificación cuando la temperatura y el pH son mínimos; la interacción temperatura - tiempo (AC) da el mayor grado de esterificación en el momento que la temperatura y tiempo están en un valor mínimo aunque en esta interacción el tiempo no tiene

mayor injerencia pues la diferencia entre sus valores mínimos y máximo en la grafica es minima; en cuanto la interacción pH – tiempo (BC) el mayor resultado esta con el pH mínimo y el tiempo máximo.

5.6 VISCOSIDAD.

TABLA N° 20 Resultados obtenidos de la viscosidad según planteamiento del diseño 2^3

N _o Muestra	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (Minutos)	Efecto	Viscosidad (cps.)
1	40.0	1.2	10	1	32.0
2				1	35.0
3			C	36.0	
4			C	36.0	
5		2.6	10	B	37.0
6				B	36.0
7			80	BC	55.0
8			80	BC	54.0
9	70.0	1.2	10	A	30.0
10				A	32.0
11			80	AC	26.0
12			80	AC	26.0
13		2.6	10	AB	37.0
14				AB	35.0
15			80	ABC	30.0
16			80	ABC	32.0

Según la tabla anterior se observan los valores de las viscosidades a las diferentes condiciones de tiempo pH y temperatura y se puede constatar una clara tendencia a la disminución de los valores de viscosidades con la disminución del pH y aumento de la temperatura observándose la ausencia de influencia del tiempo sobre los resultados obtenidos.

TABLA N° 21 Análisis de la varianza para la viscosidad

Efecto	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculada	P Valorada
A	333.0630	1	333.0630	231.70	0.0000
B	248.0630	1	248.0630	172.57	0.0000
C	27.5625	1	27.5625	19.17	0.0024
AB	33.0625	1	33.0625	23.00	0.0014
AC	232.5630	1	232.5630	161.78	0.0000
BC	60.0625	1	60.0625	41.78	0.0002
ABC	60.0625	1	60.0625	41.78	0.0002
ERROR TOTAL	11.5	8	1.4375		
TOTAL	1005.94	15			

Stargraphic en los análisis de varianza en donde se reporta el p-valor lo hace asumiendo una referencia y en este caso es el efecto 1, el que nos indica que los factores están en el valor 1 y de aquí se comparan cada efecto y sus combinaciones cuando ellos tienen un valor máximo.

Con los resultados de la tabla N° 21, se observa que los valores de p-valor del factor A (0.0000), factor B (0.0000), factor C (0.0024) y las interacciones AB (0.0014), AC (0.0002) BC (0.0002), son inferiores de 0.05 en el cual si el p-valor es mayor de 0.05 está dentro de un comportamiento normal, es decir, cuando se grafica el p-valor se tienen datos que siguen una línea recta y los anormales son resultados muy alejados de la línea recta; pero si son menores del 0.05 se sale de la normalidad, y por ello deben ser objeto de más estudio y así determinar a qué se deben esas interacciones y su efecto en las propiedades físico-químicas de la pectina estudiada.

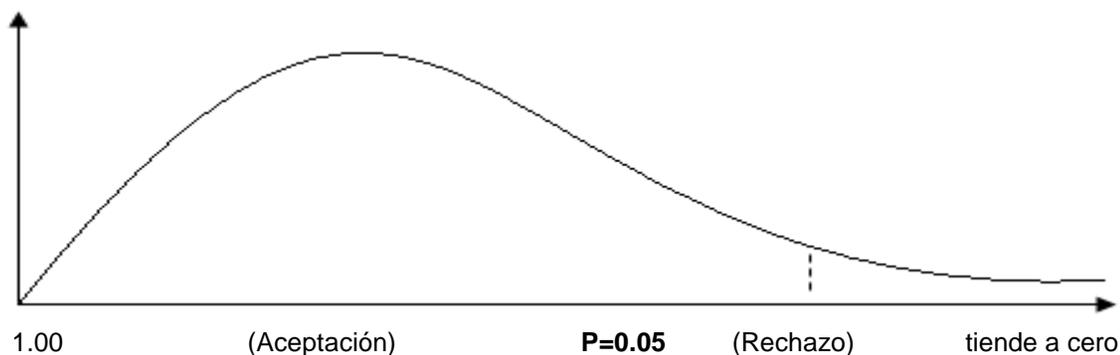


FIGURA N° 20 Gráfico de probabilidad de aceptación o rechazo de la hipótesis

Con la ayuda de la figura N° 20 se puede analizar las hipótesis:

1. Que no hay diferencia debido al factor A

H_0 : No existe diferencia entre 40°C y 70°C de temperatura de extracción, para su caracterización.

H_i : La temperatura a la cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor A dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a

$P= 0.05$, indicando que la temperatura, está dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

2. Que no hay diferencia debido al factor B

H_0 : No existe diferencia entre pH 1.2 y pH 2.6 de extracción, para su caracterización.

H_i : El pH al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor de factor B dió como resultado 0.0000, siendo un valor menor a $P=0.05$ indicando que el valor de pH está dentro del rango de rechazo pudiendo decir que es un factor que sí influye, lo que nos lleva a aceptar la hipótesis alternativa.

3. Que no hay diferencia debido al factor C

H_0 : No existe diferencia entre 10 minutos y 80 minutos de extracción, para su caracterización.

H_1 : El tiempo al cual se extrajo la pectina si interfiere al momento de su caracterización.

El valor del factor C dió como resultado 0.0024 siendo un valor menor a $P=0.05$, e indica que el tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

4. Que no hay interacción de los factores A y B

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_1 : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el pH de 1.2 y pH de 2.6, a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores A y B dió como resultado 0.0014 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - pH de

extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

5. Para probar la hipótesis que no hay interacción de los factores A y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina

H_1 : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción A y C dió como resultado 0.0000 siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción temperatura - tiempo de extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

6. Que no hay interacción de los factores B y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_1 : La caracterización de la pectina si se ve afectada por el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los factores B y C dió como resultado 0.0002siendo un valor menor a $P=0.05$, indicando que la interacción pH – tiempo de

extracción está dentro del rango de rechazo comprobando que es un factor que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

7. Que no hay interacción de los factores A,B y C

H_0 : La caracterización de la pectina no se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, ni por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

H_1 : La caracterización de la pectina si se ve afectada por la temperatura de 40°C y 70°C, el pH 1.2 y pH 2.6, así como por el tiempo de 10 minutos y 80 minutos a los cuales fueron obtenidas las muestras de pectina.

El valor de la interacción de los tres factores dio como resultado 0.0002 siendo un valor menor a $P=0.05$, lo que indica que esta dentro del rango de rechazo pudiendo afirmar que es una interacción que sí influye. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, la cual indica que las variaciones de los factores a las cuales fue extraída la Pectina, temperatura de 70°C y 40°C; pH de 2.6 y 1.2; y los tiempos de 10 y 80 minutos si afectan en la determinación de la viscosidad de la pectina obtenida.

TABLA N° 22 Coeficiente de regresión para porcentaje viscosidad

Efecto	Coeficiente	Valor
A	β_1	-0.1680270
B	β_2	-3.4523800
C	β_3	-0.2642860
AB	β_4	0.1003400
AC	β_5	0.0027551
BC	β_6	0.3690480
ABC	β_7	-0.00527211

ECUACIÓN MODELO AJUSTADO

$$\% \text{ VISCOSIDAD} = \beta_0 + \beta_1X + \beta_2Y + \beta_3Z + \beta_4XY + \beta_5XZ + \beta_6YZ + \beta_7XYZ.$$

Donde:

$$\beta_0 = 39.1905$$

X = Temperatura en °C

Y = pH

Z = Tiempo en minutos

TABLA N° 23 Respuesta optimizada

FACTOR	MENOR	MAYOR	OPTIMO
Temperatura	40.0	70.0	70.0
pH	1.2	2.6	2.6
Tiempo	10.0	80.0	80.0

Objetivo: Maximizar porcentaje Viscosidad

Valor óptimo: 54.5% Este es el valor ideal esperado de viscosidad al aplicar al diseño experimental la ecuación del modelo ajustado.

RESUMEN DEL DISEÑO

Nombre del diseño: FACTORIAL

Base del diseño

Números de factores experimentales: 3, números de bloques: 2

Números de residuos: 1

Números de repeticiones: 16

Error de grado de libertad: 8

Para identificar las condiciones de trabajo ver la figura N° 7

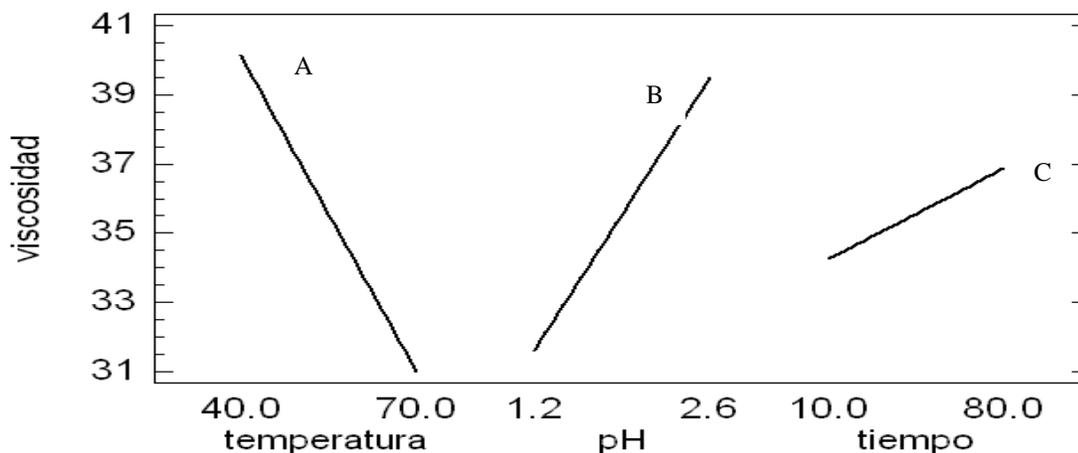


FIGURA N° 21 Gráfico de efectos principales para viscosidad.

En los gráficos de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

La figura N° 21 demuestra que el efecto de temperatura da una mayor viscosidad cuando su valor es de 40°C; el efecto del pH una mayor viscosidad cuando su valor es de 2.6; y el efecto del tiempo una mayor viscosidad cuando es de 80 minutos lo que indica que para obtener una pectina con alta viscosidad se debe trabajar con los valores mínimos de temperatura y tiempo; pH con un máximo como se muestran en el diseño de experimentos 2^3 (Ver figura N° 7)

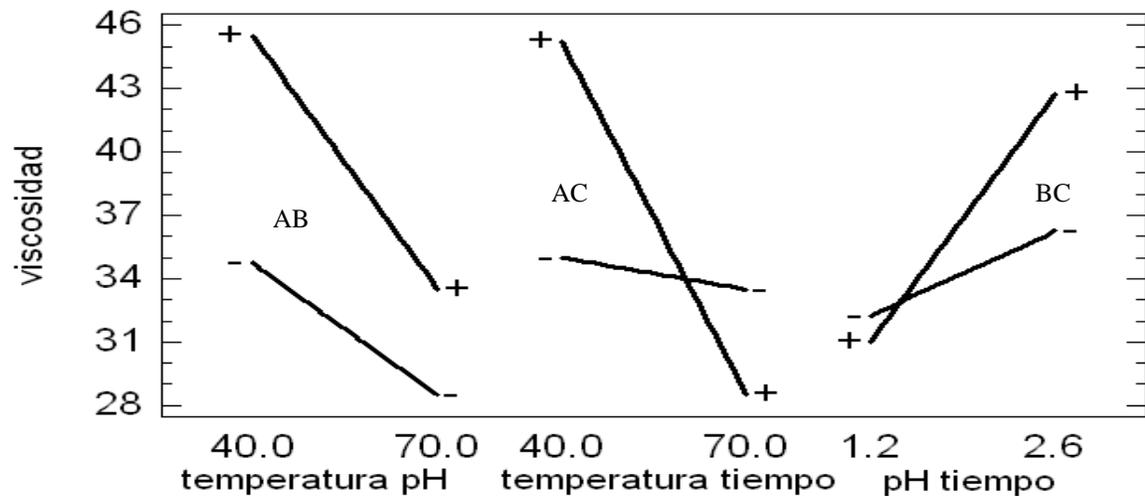


FIGURA N° 22 Gráfico de la interacción para la viscosidad

Nota: El signo (-) representa los valores mínimos trabajados.

El signo (+) representa los valores máximos trabajados.

En los gráficos de interacción de efectos principales, las líneas en cada figura están a escala donde el programa stargraphic plotea valores promedios.

La gráfica N° 22 demuestra las interacciones entre los efectos y así se determina que la interacción temperatura - pH (AB) da una mayor viscosidad cuando la temperatura es mínima y el pH es máximo; la interacción temperatura - tiempo (AC) da una mayor viscosidad en el momento que la temperatura es mínima y tiempo está en un valor máximo, en cuanto a la interacción pH - tiempo (BC) el mayor resultado está con el pH y el tiempo máximo.

5.4 REOGRAMAS

Reograma 1 de pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: ph 1.2; temperatura 40⁰ c. y tiempo de 10 minutos.

Condiciones de viscosímetro:

Marca: Brookfield

rpm: 50

Spin: 2

Tiempo de estabilización de temperatura: 10 minutos

Temperatura (°C)	Viscosidad (cps.)
X	Y
25	33.5
35	26.9
45	18.0
55	13.9

Resumen del modelo potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.989	0.978	0.971	0.074

Resumen Anova del modelo potencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresion	0.736	1	0.736	136.085	0.001
Residual	0.016	3	0.005		
Total	0.753	4			

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.989	0.978	0.971	0.074

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	0.736	1	0.736	134.782	0.001
Residual	0.016	3	0.005		
Total	0.753	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Seleccionando el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa SSPS.

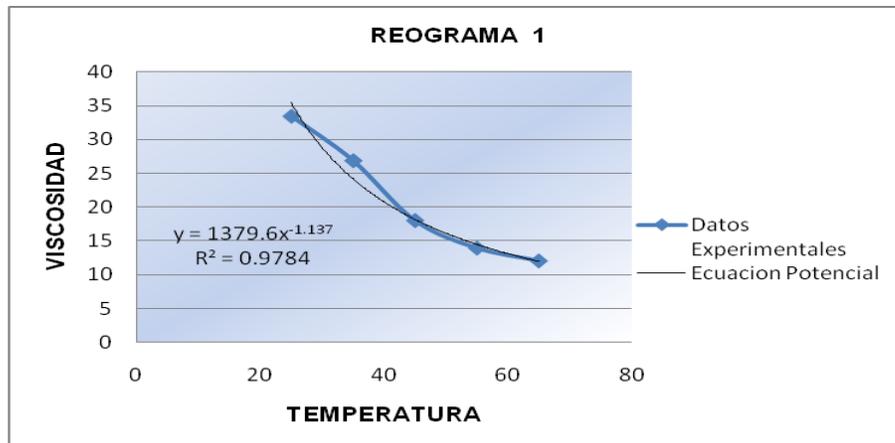


Figura N° 23: Reograma 1 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 1.2 temperatura 40° y tiempo de 10 minutos.

Para formar el reograma 1 se decide la expresión matemática potencial, ya que se observa una mejor tendencia en el gráfico. En este caso es indiferente entre utilizar la expresión exponencial y potencial ya que el valor residual es exactamente el mismo.

Reograma 2 de pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: ph 1.2; temperatura de 40⁰ c. y tiempo de 80 minutos

Temperatura (°C) X	Viscosidad (Cps.) Y
25	36.0
35	23.14
45	12.86
55	10.28
65	8.20

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.980	0.961	0.948	0.139

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	1.421	1	1.421	73.315	0.003
Residual	0.058	3	0.019		
Total	1.480	4			

Resumen del modelo potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.994	0.987	0.983	0.079

Resumen Anova del modelo potencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresion	1.461	1	1.461	232.287	0.001
Residual	0.019	3	0.006		
Total	1.480	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Se selecciona el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa SSPS.

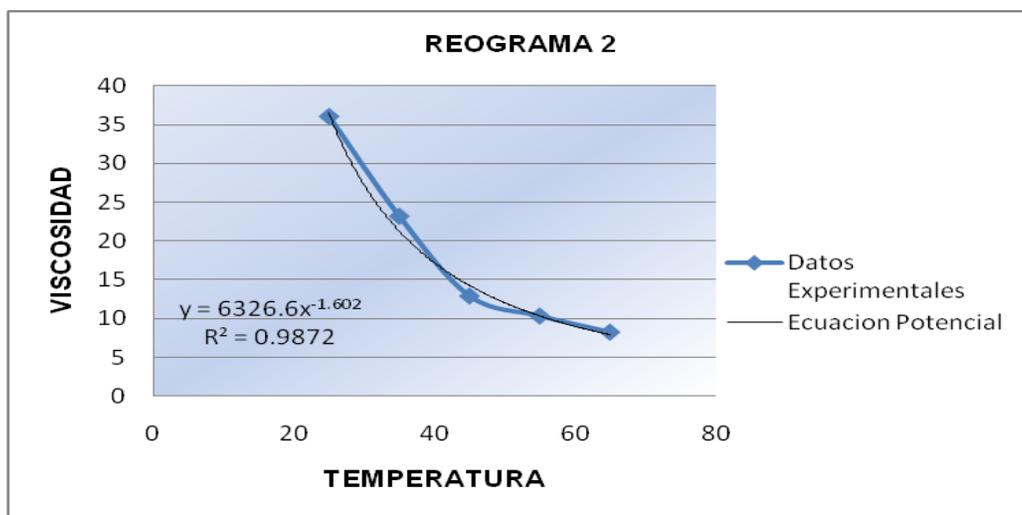


Figura N° 24: Reograma 2 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 1.2 temperatura 40° y tiempo de 80 minutos

Para formar el reograma 2 se decide la expresión matemática potencial, basados en el total de residuos ya que nos da el menor valor en comparación con la expresión exponencial en el rango de trabajo.

**Reograma 3 de pectina obtenida a las condiciones de extracción: ph 2.6;
temperatura de 40⁰ c. y tiempo de 10 minutos.**

Temperatura (°C) X	Viscosidad (Cps) Y
25	36.50
35	17.27
45	7.65
55	7.16
65	5.18

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.953	0.908	0.877	0.279

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	2.428	1	2.290	29.458	0.012
Residual	0.233	3	0.078		
Total	2.523	4			

Resumen del modelo Potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.981	0.962	0.949	0.179

Resumen Anova del modelo Potencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	2.428	1	2.428	76.075	0.003
Residual	0.096	3	0.032		
Total	2.523	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Se selecciona el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa ssps.

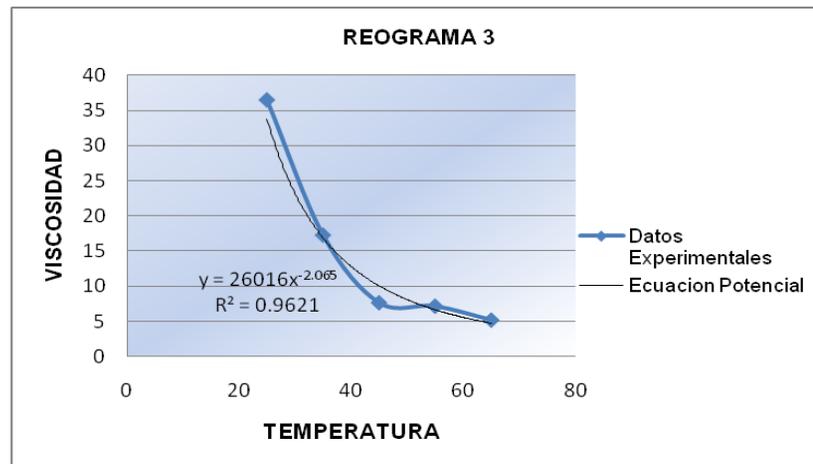


Figura N° 25: Reograma 3 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 2.6; temperatura 40° y tiempo de 10 minutos.

Para formar el reograma 3 se elige la expresión potencial ya que con esta ecuación obtenemos el menor valor residual entre las ecuaciones potenciales y exponenciales.

Reograma 4 de pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: ph 2.6; temperatura de 40⁰ c. y tiempo de 80 minutos.

Temperatura (°C) X	Viscosidad (Cps.) Y
25	54.50
35	38.33
45	26.83
55	19.16
65	15.33

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.997	0.993	0.991	0.048

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	1.043	1	1.043	447.965	0.000
Residual	0.007	3	0.002		
Total	1.050	4			

Resumen del modelo Potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.996	0.992	0.990	0.052

Resumen Anova del modelo Potencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	1.042	1	1.042	385.606	0.000
Residual	0.008	3	0.003		
Total	1.050	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Se selecciona el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa SSPS.

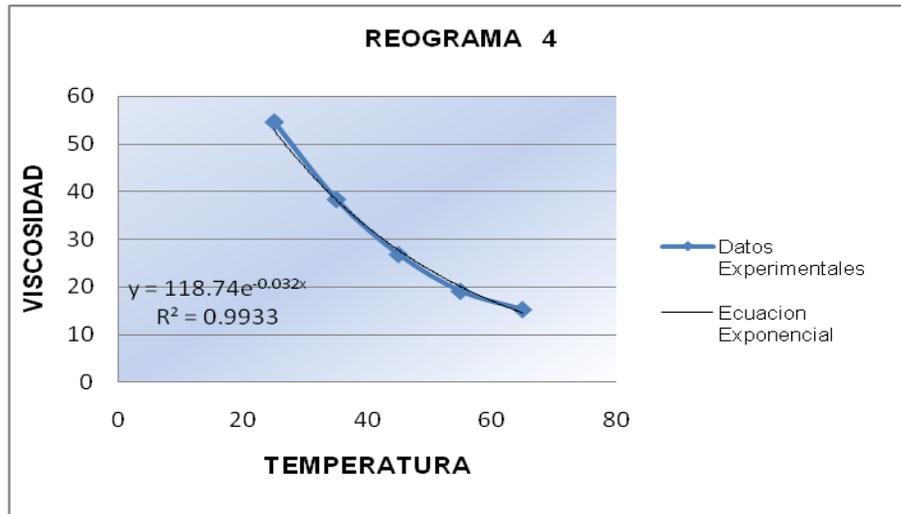


Figura N° 26: Reograma 4 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 2.6; temperatura 40° y tiempo de 80 minutos.

Para formar el reograma 4 se elige la expresión exponencial ya que con esta ecuación obtenemos el menor valor residual entre las ecuaciones potenciales y exponenciales.

Reograma 5 de pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: ph 1.2; temperatura de 70⁰ c. y tiempo de 10 minutos.

Temperatura (°C) X	Viscosidad (cps.) Y
25	31.0
35	18.58
45	14.86
55	8.54
65	6.68

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.991	0.983	0.977	0.092

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	1.480	1	1.480	173.752	0.001
Residual	0.026	3	0.009		
Total	1.506	4			

Resumen del modelo Potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.988	0.976	0.968	0.109

Resumen Anova del modelo Potencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	1.470	1	1.470	123.395	0.002
Residual	0.036	3	0.012		
Total	1.506	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Se selecciona el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa SSPS.

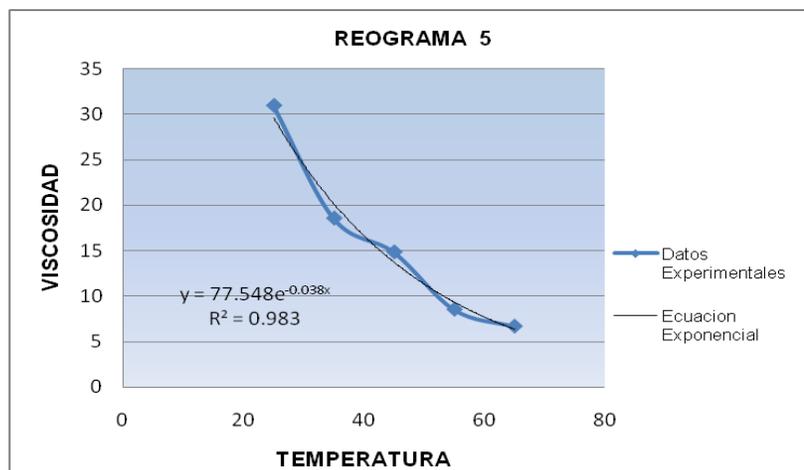


Figura N° 27: Reograma 5 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 1.2; temperatura de 70° c. y tiempo de 10 minutos.

En el reograma 5 se eligió la expresión exponencial ya que con esta ecuación obtenemos el menor valor residual entre las ecuaciones potenciales y exponenciales.

Reograma 6 de pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: ph 1.2; temperatura de 70⁰ c. y tiempo de 80 minutos.

Temperatura (°C) X	Viscosidad (cps.) Y
25	26.0
35	14.40
45	12.48
55	11.52
65	6.96

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.954	0.911	0.881	0.163

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	0.817	1	0.817	30.600	0.012
Residual	0.080	3	0.027		
Total	0.898	4			

Resumen del modelo Potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.960	0.922	0.897	0.152

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	0.828	1	0.828	35.675	0.009
Residual	0.070	3	0.023		
Total	0.898	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Se selecciona el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa SSPS.

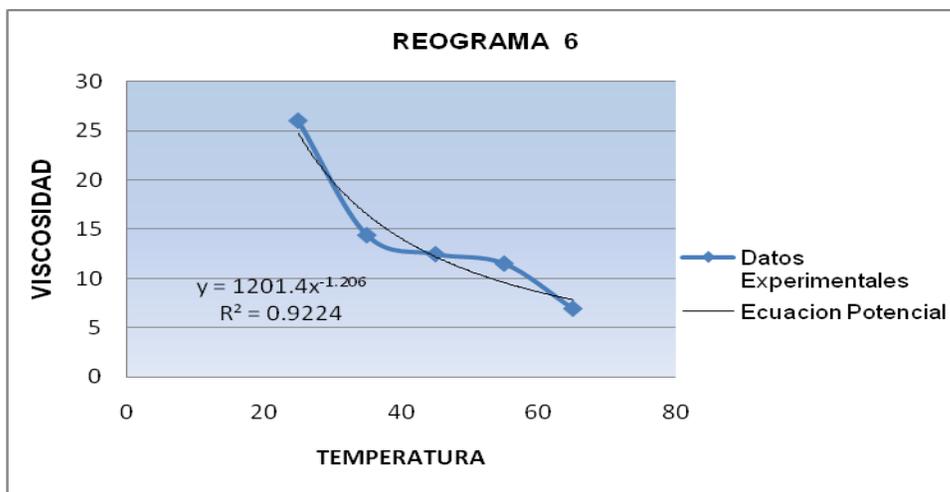


Figura N° 28: Reograma 6 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 1.2; temperatura de 70⁰ c. y tiempo de 80 minutos.

En el reograma 6 se elige la expresión potencial ya que con esta ecuación obtenemos el menor valor residual entre las ecuaciones potenciales y exponenciales.

Reograma 7 de pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: ph 2.6; temperatura de 70⁰ c. y tiempo de 10 minutos.

Temperatura (°C) X	Viscosidad (Cps.) Y
25	36.0
35	16.79
45	7.44
55	6.96
65	5.04

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.952	0.906	0.875	0.283

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	2.316	1	2.316	28.992	0.013
Residual	0.240	3	0.080		
Total	2.556	4			

Resumen del modelo Potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.981	0.962	0.949	0.181

Resumen Anova del modelo Potencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	2.458	1	2.458	72.292	0.003
Residual	0.098	3	0.033		
Total	2.556	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Se selecciona el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa SSPS.

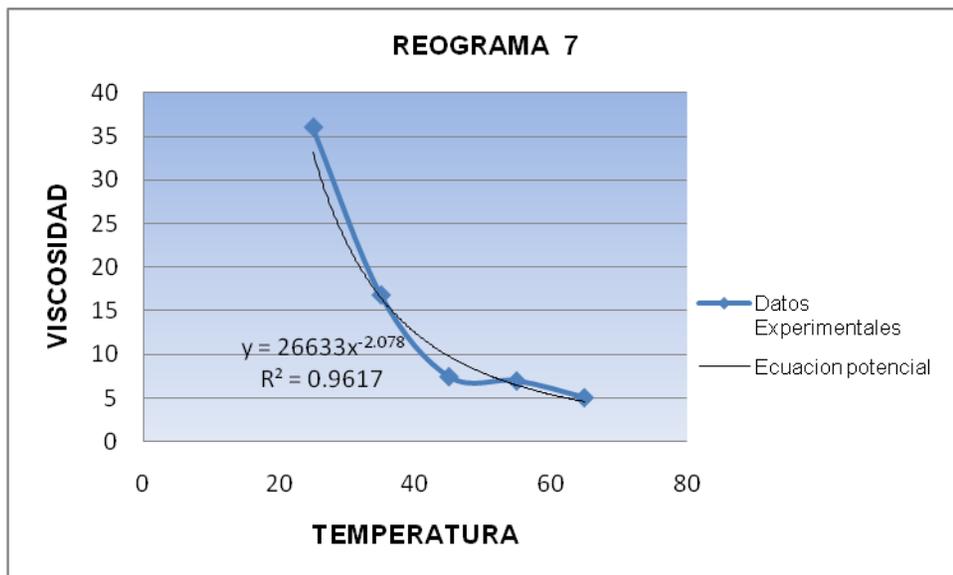


Figura N°29: Reograma 7 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 2.6; temperatura de 70⁰ c. y tiempo de 10 minutos.

En el reograma 7 se elige la expresión potencial ya que con esta ecuación obtenemos el menor valor residual entre las ecuaciones potenciales y exponenciales.

Reograma 8 de pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: ph 2.6; temperatura de 70⁰ c. y tiempo de 80 minutos.

Temperatura (°C) X	Viscosidad (Cps.) Y
25	31.0
35	19.0
45	10.56
55	8.45
65	7.80

Resumen del modelo Exponencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.959	0.919	0.892	0.194

Resumen Anova del modelo Exponencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	1.274	1	1.274	33.981	0.010
Residual	0.113	3	0.038		
Total	1.387	4			

Resumen del modelo Potencial.

R	R Square	Adjusted R Square	Std.Error of the Estimate
0.985	0.970	0.959	0.119

Resumen Anova del modelo Potencial.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Regresión	1.345	1	1.345	95.451	0.002
Residual	0.042	3	0.014		
Total	1.387	4			

Según las tablas anteriores se busca la expresión matemática que más se acerca a la línea de resultados experimentales y se trabajan con modelos potencial y exponencial. Se selecciona el modelo matemático que de un menor valor residual de suma de cuadrados y para ello se utilizó un programa SSPS.

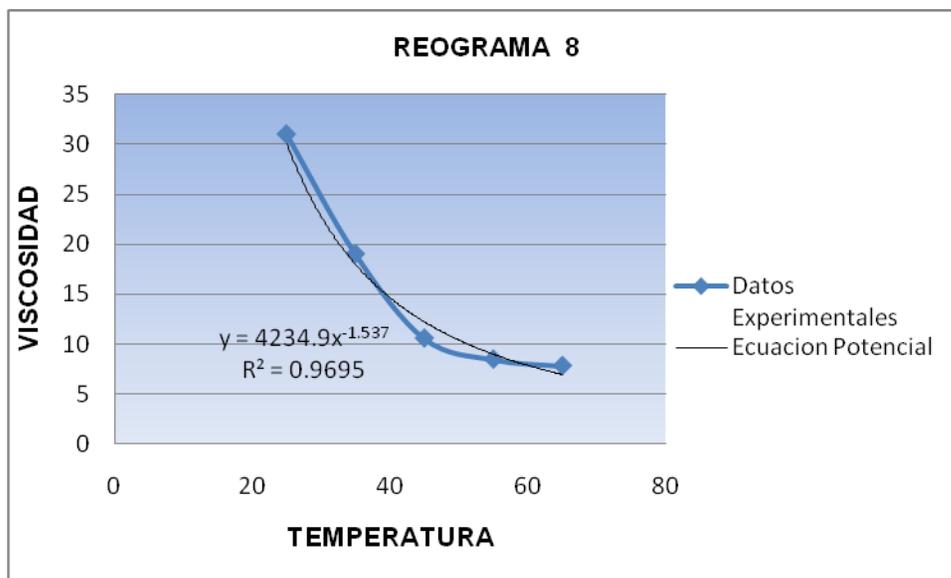


Figura N° 30: Reograma 8 de Pectina obtenida a las siguientes condiciones de extracción: pH 2.6; temperatura de 70⁰ c. y tiempo de 80 minutos.

En el reograma 8 se elige la expresión potencial ya que con esta ecuación obtenemos el menor valor residual entre las ecuaciones potenciales y exponenciales.

TABLA N° 24: Cuadro comparativo de resultados obtenidos de porcentaje de metoxilos, porcentaje de ácido galacturónico y viscosidad.

No Muestra	Temperatura (° C)	pH	Tiempo (Minutos)	Efecto	Porcentaje De Metoxilo	Porcentaje De Ácido Galacturónico	Viscosidad (Cps.)
1	40.0	1.2	10	1	2.65	88.60	32.00
2				1	2.65	87.00	35.00
3			80	C	2.05	85.95	36.00
4				C	2.05	85.95	36.00
5		2.6	10	B	5.64	64.01	37.00
6				B	5.04	64.01	36.00
7			80	BC	7.00	64.01	55.00
8				BC	7.00	64.01	54.00
9	70.0	1.2	10	A	10.85	78.01	30.00
10				A	10.85	78.01	32.00
11			80	AC	10.04	89.00	26.00
12				AC	10.04	89.00	26.00
13		2.6	10	AB	9.90	93.01	37.00
14				AB	9.90	93.01	35.00
15			80	ABC	8.50	90.05	30.00
16				ABC	8.50	90.05	32.00

Tabla de comparación de resultados obtenidos y analizados en las tablas, N°8, N° 12, y N° 20 respectivamente.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Al aumentar los tiempos de hidrólisis se produce una disminución en el rendimiento de pectina extraída. La solubilidad de la pectina se da porque ésta pasa de la fase sólida a la solución ácida, ya que en esta fase de extracción y hasta un tiempo determinado se da el agotamiento de la pectina del sustrato y a partir de aquí el predominio de la segunda hidrólisis produce una disminución en el rendimiento.
2. El porcentaje de Metoxilo se reduce al disminuir el pH, debido al aumento de la hidrólisis de ésteres en los grupos carboxilos metoxilados. Ni el tiempo ni la temperatura tienen influencia sobre el porcentaje de metoxilación.
3. Las pectinas de alto porcentaje de grupos metoxilos, no menor del 6.7% (ver anexo N°1) se obtienen al trabajar a temperaturas de 70° C, pH de 1.2 ó 2.6 y tiempos de 10 u 80 minutos.
4. Las pectinas con porcentaje de ácido galacturónico (no menor del 74%) según lo establecido por la USP 30 se obtienen al trabajar a temperaturas de 70°C y pH de 2.6
5. Los resultados obtenidos en la medición de la viscosidad y el análisis estadístico de los tres factores demuestran que el tiempo de extracción no es

un factor importante en el aumento de la viscosidad de la pectina ya que es una característica propia de sus moléculas y está relacionada directamente con su peso molecular.

6. La viscosidad de la pectina extraída disminuye a medida que se baja el pH de extracción, ya que el menor pH aumenta la degradación de las cadenas moleculares ; y la viscosidad está relacionada con su peso molecular.
7. La viscosidad de las pectinas disminuye con el aumento de temperatura como lo muestran los reogramas, debido a que la molécula se rompe y su peso molecular disminuye.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Utilizar temperatura de 70°C; pH de 1.2 ó 2.6 y un tiempo de 10 minutos, para obtener una pectina con porcentaje de metoxilo mayor de 6.7% y ácido galacturónico mayor de 74% porque a estas condiciones se obtienen pectinas que cumplen con los estándares que establece la USP 30.
2. Llevar a cabo en futuras investigaciones en las que se utilicen las siguientes condiciones, temperaturas de 70°C, pH 1.2 y un tiempo de 10 minutos para minimizar costos en el proceso de obtención debido al ahorro de reactivos y energía.
3. Realizar investigaciones en el que se comparen mas intervalos de temperatura para verificar la influencia de este factor en la viscosidad de la pectina.
4. Trabajar con temperatura de 70°C ; pH 1.2 y un tiempo de 10 minutos, para obtener una pectina con bajo grado de esterificación. Porque con estas condiciones de extracción, se rompen un mayor de número de enlaces en la estructura química de la pectina y el grado de esterificación depende de su peso molecular.

5. Trabajar para obtener una pectina con alto grado de esterificación, con temperatura de 40°C; pH 2.6 y un tiempo de 80 minutos. Porque con estas condiciones de extracción, se rompen un menor de número de enlaces en la estructura química de la pectina y el grado de esterificación depende de su peso molecular.
6. Extraer la pectina con baja viscosidad, aplicando las condiciones de temperatura de 70°C; pH 1.2 y tiempo 80 minutos. Ya que la viscosidad es muy dependiente del grado de esterificación y de la longitud de su molécula.
7. trabajar para obtener una pectina con alta viscosidad, con una temperatura de 40°C; pH 2.6 y un tiempo 80 minutos. Ya que la viscosidad es muy dependiente del grado de esterificación y de la longitud de su molécula y con estas condiciones sufre menor rompimiento de enlaces la estructura química de la molécula de pectina.
8. Realizar estudios de obtención de pectina con otros ácidos que puedan ser útiles y menos costosos para la elaboración de ésta.

9. Trabajar en la obtención de pectina con otras frutas cítricas con propiedades viscosantes, que puedan ser útiles para tal fin y poder darles un mayor valor agregado.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

8.0 BIBLIOGRAFIA

1. Arslan N, F.kar 1999 " Effect of Temperature and Concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity- molecular weight relation ship" Carbohydrate Polymers, pag. 277-284.
2. Arslan N. ;F .kar 1999 "Characterization of orange peel pectin and effect of sugars L-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solution" Carbohydrate Polymers 40, pag. 285-29
3. Betancourt Quijada,A.H 1983 Estudio comparativo de la pectina del café con la pectina cítrica comercial. Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
4. Castillo, M. y otros 2004. Influencia de la pectina sobre las propiedades reológicas del yogurt Pág.33-37.
5. Jordi pagan; G. " Degradación enzimático y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón ISBN: 89-89727-64-3 Depósito legal ,S 54-98.Server de publicaciones. Universidad de Lleida.
6. Montgomery C.D.; Ranger CG. 1996 Probabilidad y Estadística aplicadas a las ingenierías México, D.F MacGraw –Hill Interamericana Editores S.A de CV. Pág. 720-743.
7. Muller A.G.1973 Traducido por Burgos, J. Introducción a la reología de los alimentos Zaragoza, España, Editorial Acribia Pág. 133-145.

8. Moya, G.1996Producción de Pectina Revista Facultad de Agronomía Luz 13 Pág. 647-652.
9. Rodríguez Rodríguez, K.A. 2004 Extracción y Evaluación de pectina a partir de la cáscara de naranja de las variedades **Citrus sinensis** y **Citrus paradisis** y propuesta de diseño de planta piloto para su producción. Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
10. LAGOS, J. A. Compendio de Botánica Sistemática. 2^a Edición, dirección de Publicaciones del Ministerio de Salud, El Salvador , 1997.
11. The united states pharmacopeial convention Inc. 2008.Farmacopea de los Estados Unidos de America treinteava revision .Estados Unidos de America
12. Devia Pineda J.R. 2003. Proceso para producir pectinas cítricas . Universidad EAFIT Enero - Marzo, numero 129. Medellin Colombia.

GLOSARIO

GLOSARIO⁽⁵⁾

Ácido galacturónico: El ácido D-galacturónico es un monosacárido de 6 átomos de carbono correspondiente a la forma oxidada de la D-galactosa, por lo que también. Pertenece al grupo de los azúcares ácidos. Es el principal componente de las pectinas, donde puede encontrarse en forma de ácido poligalacturónico. Presenta un grupo aldehído en el carbono 1 y un grupo carboxilo en el carbono 6.

Pectina: Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de Células vegetales. En presencia de aguas forman geles. Determinan la porosidad de la pared y por tanto el grado de disponibilidad de los sustratos de los enzimas implicados en las modificaciones de la misma. Las pectinas también proporcionan superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico."

Hidrólisis: Es un proceso mediante el cual se descompone el agua en sus elementos constituyentes hidrógeno y oxígeno, por acción de la corriente eléctrica o se rompe una molécula por la acción del agua.

Diseño experimental: Es el nombre con el que se conoce la serie de pasos que hay que dar para crear un experimento científico, es decir, para responder una pregunta, para llegar a una verdad, para confirmar la veracidad o la falsedad de una hipótesis. El experimento es un estudio en el que se manipulan

deliberadamente una o más variables (independientes), con el objetivo de analizar su efecto sobre otras (Dependientes), es decir, la determinación de las relaciones de causa-efecto, en el marco de una situación controlada de sus elementos principales.

Reograma: Es una notación grafica para describir conjuntos de relaciones de ecuaciones lineales los reogramas se usan para dar solución a dichas ecuaciones y para construir directamente modelos de sistemas lineales.

Valoración de saponificación: La saponificación es una reacción química entre un ácido graso (o un lípido saponificable, portador de residuos de ácidos grasos) y una base o álcali, en la que se obtiene como principal producto la sal de dicho ácido y de dicha base. Estos compuestos tienen la particularidad de ser anfipáticos, es decir tienen una parte polar y otra apolar (o no polar), con lo cual pueden interactuar con sustancias de propiedades dispares.

Viscosidad: Propiedad de un fluido que tiende a oponerse a su flujo cuando se le aplica una fuerza. La viscosidad es una propiedad de los fluidos que es de gran importancia en múltiples procesos industriales, además de ser una variable de gran influencia en las mediciones de flujo de fluidos, el valor de viscosidad se usa como punto de referencia en la formulación de nuevos productos, facilitando la reproducción de la consistencia de un lote a otro.

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

Tixotropía: Propiedad de algunos fluidos no newtonianos y pseudoplásticos que muestran un cambio dependiente del tiempo en su viscosidad.

Histéresis: Es la tendencia de un material a conservar una de sus propiedades en ausencia del estímulo que la ha generado.

Sinéresis: Es la extracción o expulsión de un líquido o gel por lo que el gel pasa de ser una sustancia homogénea a una segregación de componentes sólidos separados y contenidos en la fase líquida.

Pectina grado farmacéutico: Toda pectina obtenida que cumple con estándares de calidad USP.

ANEXOS

ANEXO N° 1

MONOGRAFIA DE PECTINA USP 30.

Pectina

Pectina [9000-69-5].

» La Pectina es un carbohidrato purificado que se obtiene a partir del extracto ácido diluido de la porción interna de la cáscara de los frutos cítricos o de la pulpa de la manzana. Contiene principalmente ácidos poligalacturónicos parcialmente metoxilados.

La Pectina contiene no menos de 6,7 por ciento de grupos metoxilo ($-\text{OCH}_3$) y no menos de 74,0 por ciento de ácido galacturónico ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$), calculado con respecto a la sustancia seca.

NOTA — La pectina comercial para la producción de productos alimenticios gelatinosos se normaliza por conveniencia a “grado 150 de gelatinización” mediante la adición de dextrosa u otros azúcares y algunas veces contiene citrato de sodio u otras sales amortiguadoras.

Esta monografía hace referencia a la pectina pura a la que no se le han agregado tales productos.

Envasado y almacenamiento — Conservar en envases impermeables.

Etiquetado — Etiquetar indicando si proviene de manzana o de cítricos.

Identificación —

A: Calentar 1 g con 9 mL de agua en un baño de vapor, reponiendo el agua perdida en la evaporación, hasta que se forme una solución que se forma un gel firme al enfriarse.

B: A una solución (1 en 100), agregar el mismo volumen de alcohol: se forma un precipitado translúcido y gelatinoso (diferenciación de la mayoría de las gomas).

C: A 5 mL de una solución (1 en 100) agregar 1 mL de hidróxido de sodio 2N y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos: se forma un gel o semigel (diferenciación de la goma tragacanto).

D: Acidificar el gel de la prueba anterior con ácido clorhídrico 3N y agitar: se forma un precipitado voluminoso, incoloro y gelatinoso que al hervirlo se torna blanco y floculento (ácido pectínico).

Límites microbianos <61> — Cumple con los requisitos de la prueba para la ausencia de *Salmonella* spp.

Perdida por secado <731>—Secar a 105°C durante 3 horas: no pierde más de 10,0% de su peso.

Arsénico, Método II <211>: 3 ppm.

Plomo—Agregar 2,0 g de Pectina a 20 mL de ácido nítrico en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, mezclar y calentar el contenido cuidadosamente hasta que se disuelva la Pectina. Continuar el calentamiento hasta que el volumen se reduzca hasta aproximadamente 7 mL. Enfriar rápidamente hasta temperatura ambiente, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con agua. Una porción de 50,0 mL de esta solución no contiene más de 5 mg de plomo (correspondiente a no más de 0,0005% de Pb) cuando

se prueba conforme a la prueba de límite de Plomo <251>, utilizando 15 mL de solución de citrato de amonio, 3 mL de solución de cianuro de potasio y 500 mL de solución de clorhidrato de hidroxilamina. Después de las primeras extracciones con ditizona, lavar las capas de cloroformo combinadas con 5 mL de agua, desechar la capa de agua y continuar de la manera habitual extrayendo con 20 mL de ácido nítrico diluido (1 en 100).

Azúcares y ácidos orgánicos—Colocar 1 g en un matraz de 500 mL, humedecer con 3 a 5 mL de alcohol, verter rápidamente 100 mL de agua, agitar y dejar en reposo hasta su completa disolución. Agregar a esta solución 100 mL de alcohol que contenga 0,3 mL de ácido clorhídrico, mezclar y filtrar rápidamente. Medir 25 mL del filtrado en una cápsula tarada, evaporar el líquido en un baño de vapor y secar el residuo en un horno de vacío a 50° durante 2 horas: el peso del residuo no es mayor de 20 mg.

Impurezas orgánicas volátiles, Método IV <467>: cumple con los requisitos. (Oficial hasta el 18 de julio de 2007)

Valoración de grupos metoxilo—Transferir 5,00 g de Pectina a un vaso de precipitados adecuado y agitar durante 10 minutos con una mezcla de 5 mL de ácido clorhídrico y 100 mL de alcohol al 60 por ciento. Transferir a un filtro de vidrio sinterizado (crisol de 30 a 60 mL o tipo Buchner, poro grueso) y lavar con seis porciones de 15 mL de la mezcla de ácido clorhídrico - alcohol al 60 por ciento, seguido de alcohol al 60 por ciento hasta que el filtrado este libre de cloruros. Finalmente, lavar con 20 mL de alcohol, secar durante 1 hora a 105°, enfriar y pesar. Transferir exactamente una décima parte del total del peso neto de la muestra seca (representa 500 mg de la muestra original sin lavar) a un matraz Erlenmeyer de 250 mL y humedecer con 2 mL de alcohol. Agregar 100 mL de agua libre de dióxido de carbono, insertar el tapón y agitar ocasionalmente por rotación moderada hasta que la Pectina se disuelva por completo.

Agregar 5 gotas de fenolftaleína SR, valorar con hidróxido de sodio 0,5N SV y registrar los resultados como título inicial. Agregar 20,0 mL de hidróxido de sodio 0,5N SV, insertar el tapón, agitar vigorosamente y dejar en reposo durante 15 minutos. Agregar 20,0 mL de ácido clorhídrico 0,5N SV y agitar hasta que desaparezca el color rosa. Agregar fenolftaleína SR y valorar con hidróxido de sodio 0,5N SV hasta un color rosado tenue que persiste después de agitar vigorosamente: registrar este valor como título de saponificación. Cada mL de hidróxido de sodio 0,5N utilizado en el título de saponificación equivale a 15,52 mg de $-OCH_3$.

Valoración de ácido galacturónico—Cada mL de hidróxido de sodio 0,5N utilizado en la volumetría total (el título inicial sumado al título de saponificación) en la Valoración de grupos metoxilo equivale a 97,07 mg de $C_6H_{10}O_7$.

ANEXO N° 2

DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN BOTANICA DE PLANTA Y FRUTO DE *(Citrus Paradisi)*

Árbol de ocho a quince metros de altura, extendido, de ramas bajas con espinas largas y fuertes. Hojas lisas pequeñas, ovales, flores color blanco o cremoso. Frutos de forma esférica, achatados por los polos de unos 7.5 a 15 centímetros, posee un sabor refrescante ligeramente amargo, se caracteriza por tener pocas semillas de gran tamaño₍₁₀₎.

El pomelo es el cítrica de mayor tamaño y de ahí su denominación latina *Citrus grandis*. Sus frutos nacen en racimos lo que también explica su nombre en ingles: Grape-fruit. (Figura N° 31)

La corteza es de color amarillo claro, y rica en esencias; la fibra es de color blanquecino y rica en pectina. (Figura N° 31).

CLASIFICACIÓN BOTANICA DE *Citrus paradisis*.

Reino	:	Plantae
División	:	Anthophita
Subdivisión	:	Angiosperma
Clase	:	Dicotiledóneas
Familia	:	Retaceas
Subfamilia	:	Aurantiodeae
Tribu	:	Citrieae

Subtribu : Citrinae
Género : Citrus
Subgénero : Eucitrus
Especie : paradisi
Variedad : Grape fruit, Toronja, Pomelo

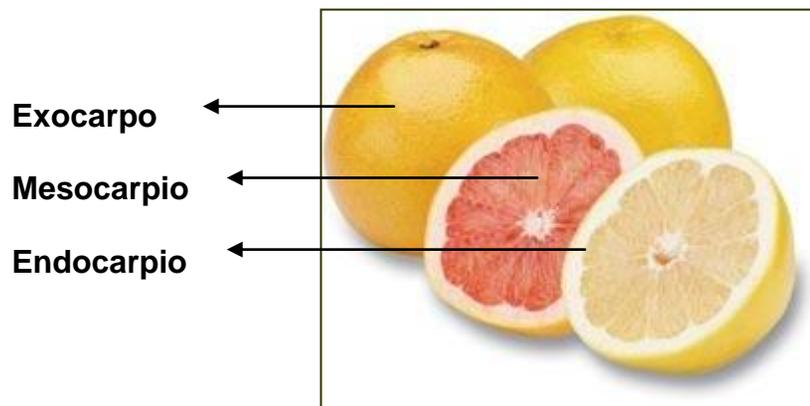


FIGURA N° 31 Corte transversal de la *Citrus paradisi*

ANEXO N° 3

MATERIAL A UTILIZAR

- Bandeja de Alumínio.
- Beakers de 2000, 100, 50,25, ml.
- Termômetro 100 mmHg.
- Embudo Buchner
- Kitasato
- Agitadores de Vidrio
- Crisol
- Probeta de 25, 50, 100 ml.
- Erlemmeyer de 250 ml.
- Bureta de 50 ml.
- Pipetas de 2.0mL, 5.0mL

ANEXO N° 4

EQUIPO A UTILIZAR

- Estufa Precisión Specific modelo 25 EG 65 – 210 UL OVEN
- Molino de Martillo Thomas Wiley Laboratory Modelo 4 Thomas Scientific USA
- Balanza Analítica
- Balanza Granataria
- Viscosímetro Brookfiel
- pHmetro
- Cocina Eléctrica
- Soporte
- Pinza de sostén
- Pinza de extensión
- Pinza para bureta
- Bomba al vacío

ANEXO N° 5

REACTIVOS A USAR

- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido clorhídrico 3N
- Ácido clorhídrico 0.5N
- Hidróxido de Sodio 2N
- Hidróxido de Sodio 0.5N
- Hidróxido de Sodio 0.1N
- Etanol 60% (v/v)
- Fenofaleína