



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y  
Control de Calidad Químicos

**Caracterización de la pectina extraída de residuos y  
subproductos agroalimentarios**

*Autor: Miguel García Sánchez*

*Tutor/es: Mónica Coca Sanz/María Teresa García Cubero*

## Contenido

Resumen.....	4
1. Introducción .....	5
1.1. Características de la pectina.....	5
1.1.1. Características estructurales de la pectina .....	6
1.1.2. Propiedades químicas de la pectina.....	9
1.2. Aplicaciones de la pectina .....	13
2. Objetivos .....	14
3. Materiales y métodos .....	15
3.1. Materiales y equipo.....	15
3.2. Reactivos .....	15
3.3. Disoluciones .....	16
3.4. Análisis estadístico de los resultados.....	17
3.5. Métodos .....	17
3.5.1. Determinación de ácido galacturónico .....	17
3.5.1.1. <i>Determinación del contenido en ácido galacturónico según la metodología de Filisetti-Cozzi y Carpita</i> .....	18
3.5.1.2. <i>Determinación del contenido en ácido galacturónico según la metodología de Melton-Smith</i> .....	19
3.5.1.3. <i>Determinación del contenido en ácido galacturónico según la metodología de Anthon-Barret</i> .....	20
3.5.2. Determinación de azúcares totales.....	20
3.5.2.1. <i>Determinación de azúcares totales mediante el método del reactivo fenol-sulfúric</i> .....	21
3.5.2.2. <i>Determinación de azúcares totales mediante el método del reactivo antrona</i> .....	21
3.5.3. Determinación de azúcares neutros mediante HPLC.....	22
3.5.3.1. <i>Hidrólisis ácida de pectina con ácido trifluoroacético</i> .....	22
3.5.3.2. <i>Hidrólisis ácida de pectina con ácido sulfúrico</i> .....	23
3.5.4. Determinación del grado de esterificación .....	23
3.5.5. Proceso de extracción de la pectina.....	24
4. Resultados experimentales .....	24
4.1. Determinación de ácido galacturónico. Validación del método espectrofotométrico. .....	24
4.1.1. Linealidad de la respuesta.....	24
4.1.1.1. Linealidad de respuesta del método de Filisetti-Cozzi y Carpita.....	24
4.1.1.2. Linealidad de respuesta del método de Melton-Smith.....	25

4.1.1.3.	Linealidad de respuesta del método de Anthon-Barret.....	26
4.1.2.	Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método espectrofotométrico. Ácido Galacturónico.....	27
4.1.3.	Precisión de los resultados del método de Filisetti-Cozzi y Carpita.....	28
4.1.4.	Precisión de los resultados del método de Melton-Smith.....	29
4.1.5.	Precisión de los resultados del método de Anthon-Barret.....	31
4.1.6.	Determinación de ácido galacturónico. Resumen de los resultados.....	33
4.2.	Determinación de azúcares totales. Validación del método espectrofotométrico. ....	33
4.2.1.	Linealidad de respuesta del método del reactivo fenol-sulfúrico.....	33
4.2.2.	Linealidad de respuesta del método del reactivo antrona. ....	34
4.2.3.	Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método espectrofotométrico. Azúcares Totales. ....	35
4.2.4.	Precisión de los resultados del método del reactivo del fenol-sulfúrico. ....	36
4.2.5.	Precisión de los resultados del método del reactivo antrona.....	37
4.2.6.	Determinación de azúcares totales. Resumen de los resultados. ....	39
4.3.	Determinación de azúcares neutros. Validación del método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	39
4.3.1.	Linealidad de la respuesta de D-Glucosa .....	39
4.3.2.	Linealidad de la respuesta de D-Galactosa .....	40
4.3.3.	Linealidad de la respuesta de ácido D-Galacturónico.....	41
4.3.4.	Linealidad de la respuesta de L-Arabinosa.....	41
4.3.5.	Linealidad de la respuesta de L-Ramnosa .....	42
4.3.6.	Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método de cromatografía líquida a alta presión (HPLC). Azúcares Neutros. ....	43
4.3.7.	Precisión de los resultados de la cromatografía líquida de alta presión. Azúcares neutros	44
4.3.8.	Determinación de azúcares neutros. Resumen de los resultados.....	50
4.4.	Determinación del grado de esterificación. Validación del análisis volumétrico. ....	50
4.4.1.	Precisión de los resultados del grado de esterificación. ....	50
5.	Discusión de los resultados .....	51
6.	Conclusión .....	54
7.	Bibliografía .....	54

## Resumen

En las últimas décadas ha habido un aumento progresivo de la demanda de productos más saludables, ecológicos y menos contaminantes, además de la exploración de nuevas maneras de utilizar los subproductos que se generan en la industria agroalimentaria para la obtención de ingredientes funcionales. A partir de los subproductos agroalimentarios se puede extraer pectina, compuesto de interés debido a sus propiedades gelificantes y dietéticas. Por todo ello, en el presente Trabajo de Fin de Máster se ha realizado una caracterización química y estructural de pectinas comerciales y extraída de la pulpa de remolacha. Además, se ha realizado un estudio estadístico de los parámetros analíticos básicos de los diferentes métodos según la IUPAC.

Previamente a la caracterización se han comparado diferentes métodos analíticos aplicados en bibliografía para determinar propiedades de la pectina tales como la concentración de azúcares totales, monosacáridos neutros, ácido galacturónico y grado de esterificación.

Tras la puesta a punto se ha concluido que el método de Melton-Smith es el más adecuado para determinar ácido D-Galacturónico. El método que usa el reactivo fenol-sulfúrico proporciona una precisión adecuada para realizar análisis de azúcares totales. Por otra parte, una hidrólisis previa de la pectina con ácido sulfúrico permite detectar y cuantificar por HPLC diferentes monosacáridos neutros contenidos en pectina.

Palabras clave: Pectina, Ácido Galacturónico, Grado Esterificación, Azúcar Total, Monosacáridos neutros

## 1. Introducción

Hoy en día se ha incrementado el interés por los productos naturales y por ingredientes alimentarios con propiedades saludables. Algunas materias primas necesarias para la vida humana comienzan a escasear y existe una importante contaminación del medio ambiente. A esto último también contribuye el sector hortofrutícola, en el cual una importante proporción de producto es desechado, lo que genera grandes cantidades de materia contaminante y subproductos. Estos subproductos, que consisten generalmente en cáscaras, semillas y pulpas de las frutas y verduras, tienen propiedades nutricionales de gran interés, con un gran potencial para la obtención de ingredientes funcionales, utilizables en propiedades alimentarias como la gelificación, hidratación y la capacidad antioxidante.

Por todo ello, el aprovechamiento de los subproductos ha tomado una gran relevancia a nivel mundial y se ha tomado conciencia de que los subproductos pueden ser útiles en otras aplicaciones. Dentro del sector hortofrutícola el de los cítricos es de gran importancia y se ha convertido en una actividad integral donde participan empresas dedicadas a obtener distintos productos, frutas en fresco, pelada y troceada, producción de zumos, concentrados y pulpas. Sin embargo, a medida que la producción crece, aumenta también la generación de residuos sólidos y líquidos. Estos residuos están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, aceites esenciales, flavonoides y vitaminas, y pueden ser valorizables.

Un ejemplo del aumento de la generación de residuos se puede encontrar en la producción de cítricos, ya que se procesan más de 120 millones de toneladas en todo el mundo al año y el 40% es utilizado por la agroindustria para extraer cerca de la mitad del peso del fruto como zumo. Los subproductos, la cáscara, semillas y pulpa, se convierten en residuos o subproductos. Así, tan solo en España, la cantidad de residuos ascienden a 600.000 toneladas por año y se estima que, mundialmente, se generan alrededor de 20 millones al año . Este ejemplo y muchos más casos actuales en la generación de residuos de productos hortofrutícolas lleva a los investigadores y a la industria a explorar diferentes formas de mejorar la productividad en términos de calidad y seguridad, disminuir la cantidad de residuos y utilizar estos para desarrollar nuevos productos e ingredientes con funcionalidades adicionales o mejoradas [1].

Entre todos ellos, destaca el importante contenido en carbohidratos de estos residuos que pueden tener importantes y numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica y agroalimentaria. En este último sector, los distintos carbohidratos presentan características tecnológicas, mecánicas y nutricionales que los hacen muy apropiados como ingredientes funcionales. Entre los carbohidratos, la fibra dietética se considera como un ingrediente con funcionalidad específica. Debido a su estructura y composición, tanto la fibra soluble como la insoluble, presentan un amplio rango de atributos tecnológicos, destacando su capacidad gelificante, ya que puede ser utilizada para reemplazar compuestos lipídicos. Además, se ha visto que puede beneficiar un desarrollo adecuado del microbiota intestinal. Estas propiedades forman parte de la pectina, una macromolécula polimérica que forma parte de todos los subproductos mencionados anteriormente, y que presenta una amplia diversidad de características.

### 1.1. Características de la pectina

Las paredes de las células vegetales se componen principalmente de polisacáridos, además de que están compuestas por proteína, lignina y otros compuestos inorgánicos. En frutas y

verduras, donde las partes comestibles generalmente consisten en células de parénquima y espacios intercelulares, las paredes celulares están constituidas en gran parte por pectina, siendo el polisacárido más abundante. La pectina define la mecánica y propiedades funcionales de la pared celular, durante la maduración de los frutos, desde el almacenamiento hasta el procesamiento de productos a base de frutas y verduras. [2]

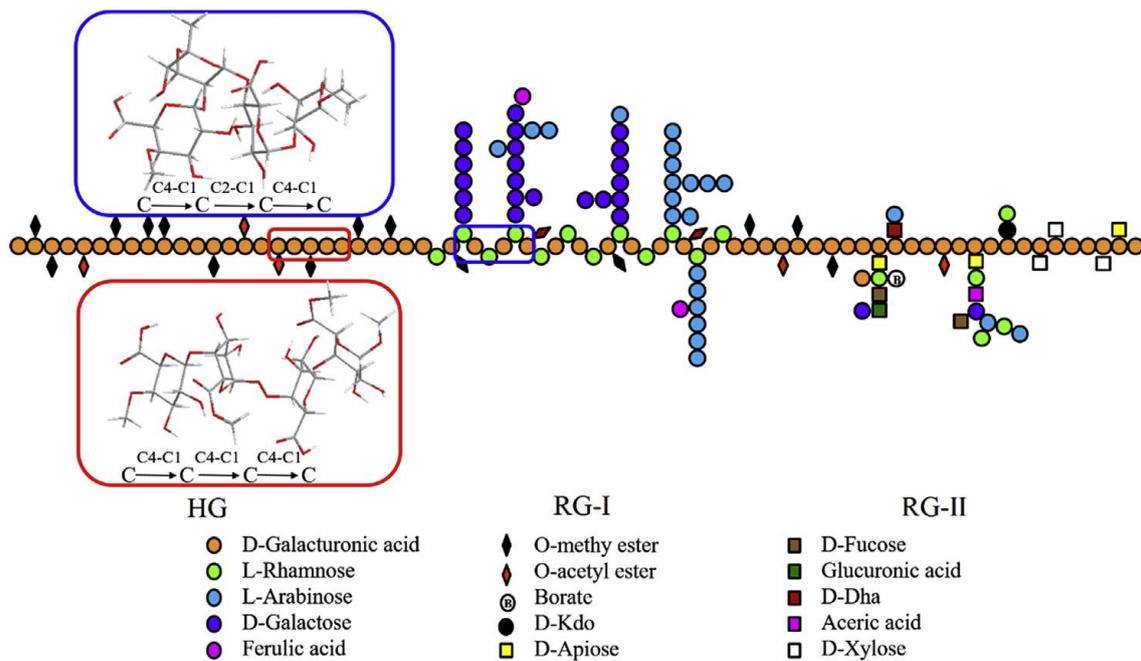
Existe una tremenda variabilidad en la composición general de la pectina en todo el reino vegetal. Los vegetales contienen pectina y protopectina. Este último es una combinación de pectina y celulosa, que es insoluble en agua, y, por lo tanto, para extraer la totalidad de la pectina de las cascaras es necesario realizar hidrólisis ácida. [3]

#### 1.1.1. Características estructurales de la pectina

La columna vertebral de la pectina son los residuos de ácido urónico unidos a través de enlaces glucosídicos 1-4. El comité de expertos en aditivos alimenticios de la Organización de Alimentación y Agricultura (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comisión Europea han definido que la pectina contiene al menos un 65% de ácido galacturónico, un homogalacturano. La estructura principal presenta cadenas ramificadas de azúcares simples compuestas de glucosa, fructosa, manosa y galactosa, xilosa y arabinosa. [4]

El ácido galacturónico comprende más del 80% del total de carbohidratos de pectina, mientras que el 20% restante corresponden con, principalmente, azúcares neutros como, por ejemplo D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y D-xilosa. El ácido galacturónico está presente en tres formas poliméricas:

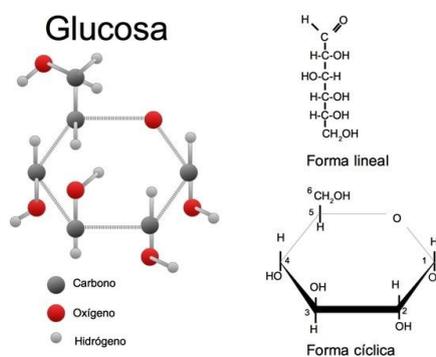
- Homogalacturonano (HG): un polímero lineal de un enlace 1-4 de ácidos galacturónicos que representa aproximadamente el 65% de la pectina.
- Rhamnogalacturonano I (RG-1): un disacárido repetitivo de ácido galacturónico y ramnosa que representa del 20 al 35% de la pectina con cadenas laterales neutrales unidas a la posición O-4 y a veces la posición O-3 de las unidades de estructura principal  $\alpha$ -L-ramnopiranosilo. Entre 20% y 80% de los residuos de Ramnosa se sustituyen en C-4, dependiendo del tipo de vegetal, así como las condiciones de extracción utilizadas.
- Rhamnogalacturonano II (RG-II): una columna vertebral homogalacturónica con numerosas cadenas laterales complejas que contienen ramnosa y otros azúcares neutros que compone del 2 al 10% de la pectina, considerándose el dominio más conservado entre moléculas de pectina. En la *Figura 1* se puede observar un esquema de la estructura la pectina.



*Figura 1 Composición estructural química simplificada de la pectina [5]*

HG es el más abundante de los tres polímeros y el grado en el que está metilesterificado tiene un gran impacto sobre las propiedades funcionales de la pectina, como la capacidad de formar geles en presencia de calcio. A mayor grado de esterificación, mayor es la temperatura de gelificación [20]. Debido a su estructura lineal, a menudo se hace referencia al HG como la "smooth region", mientras que las regiones ramificadas que incluyen RG-I, RG-II y xilogalacturonano (XG) se denominan pertenecientes a las "hairy region". [5] [6].

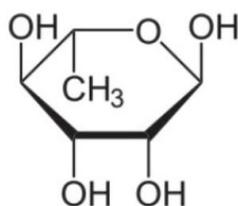
La D-Glucosa es uno de los pocos monosacáridos que forman parte de la estructura principal de la pectina, el cual puede estar unido a esta a través de enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) en formas de cadenas laterales cortas. Es una aldohexosa y es un isómero de la galactosa, siendo el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, tanto de forma libre como en combinación con otros compuestos. Todas las frutas y vegetales tienen ciertas cantidades de glucosa, a menudo emparejada con fructosa, y pueden ser extraídas mediante hidrólisis enzimática del almidón, siendo los cítricos el tipo de fruta más común del que se realizan las extracciones de glucosa. En la *Figura 2* se puede observar su estructura química, con una representación de sus formas lineal y circular.



*Figura 2 Estructura química de la D-glucosa [7]*

La L-ramnosa es un monosacárido de seis carbonos que pertenece al grupo de las metilpentosas y las desoxihexosas y que forma parte de la cadena principal de la pectina unida al ácido galacturónico, formando RG-I y RG-II. Normalmente se encuentra en bacterias patógenas y en tejidos vegetales formando parte estructural de flavonoides glicosilados, terpenilglicosidos, pigmentos de plantas y complejos heteropolisacáridos. En las ocasiones donde se extrae ramnosa de subproductos vegetales mediante hidrólisis ácida, el producto de extracción no solo contiene ramnosa, si no también otros azúcares neutros contaminando la extracción de ramnosa.. En la *Figura 3* se muestra la estructura cíclica de dicho monosacárido.

Los métodos industriales de obtención de L-ramnosa a partir de fuentes naturales de interés económico tienen en común la etapa inicial de hidrólisis a través de diferentes tratamientos ácidos (orgánicos, inorgánicos, resinas, etc.) que liberan al monosacárido L-ramnosa del glicósido o del polisacárido de partida, obteniéndose hidrolizados que contienen otras aldohexosas de difícil separación de L-ramnosa. Dichos métodos difieren unos de otros fundamentalmente en el procedimiento de purificación, según el cual pueden clasificarse en dos grandes grupos: Aislamiento mediante las técnicas cromatográficas habituales y eliminación de las otras aldohexosas (especialmente D-Glucosa) mediante microorganismos que las consumen selectivamente y enriquecen el hidrolizado en L-ramnosa. [8]



*Figura 3 Estructura química cíclica de la L-Ramnosa [8]*

La arabinosa es un monosacárido de cinco átomos de carbono, y ya que posee un grupo funcional aldehído en su estructura, se clasifica dentro del grupo de las aldopentosas y forma parte de la columna vertebral de la pectina unido al ácido galacturónico. En la *Figura 4* se puede observar su composición química y sus proyecciones de Fisher. Su nombre deriva de la goma arábica, de donde fue aislado por primera vez. Es un azúcar exclusivo de los organismos vegetales y tiene un enorme potencial en las aplicaciones industriales. [9]

El sabor dulce de la L-arabinosa es similar al de la sacarosa, pero es solo con la mitad de dulzura. Naturalmente se produce arabinosa en la forma L, y no es metabolizable por animales; por tanto, es un azúcar no calórico. Además, inhibe fuertemente de forma no competitiva la sacarasa intestinal y consecuentemente inhibe la absorción de sacarosa del intestino delgado. Es ampliamente utilizado en el desarrollo de agentes antivirales como los análogos de nucleósidos, y es una materia prima en la fabricación de L-ribosa, que se utiliza en aplicaciones farmacéuticas. [10]

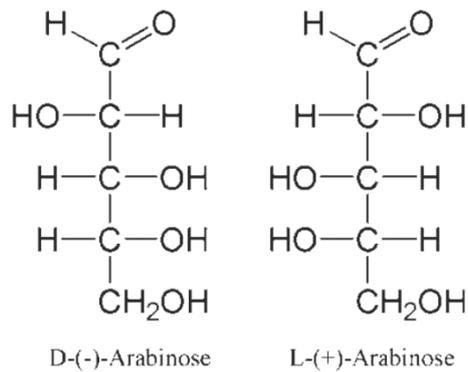


Figura 4 Proyección de Fisher para la D-(-) y la L-(+)-Arabinosa [9]

La galactosa es un monosacárido formado por seis átomos de carbono o hexosa y además es una aldosa, que se convierte en glucosa en el hígado como aporte energético. En la *Figura 5* puede observarse su composición estructural química en su forma cíclica. Además forma parte de los glucolípidos y glucoproteínas de las membranas celulares, sobre todo de las neuronas. La galactosa es sintetizada por las glándulas mamarias para producir lactosa, que es un disacárido formado por la unión de glucosa y galactosa, por tanto, el mayor aporte de galactosa en la nutrición proviene de la ingesta de lactosa de la leche. [11]

La galactosa es uno de los monosacáridos más comunes y desempeña varias funciones biológicas. Por ejemplo, actúa como una alternativa a la glucosa cuando esta última es insuficiente para las demandas metabólicas de un organismo. Puede entrar en la glucólisis para sintetizar energía. Es un componente de la lactosa, el disacárido de la leche. Los seres humanos y otros animales productores de leche biosintetizan la lactosa a partir de la galactosa y la glucosa. Además, es un componente de los cerebrósidos y, como tales, se denominan galactocerebrósidos. Los galactocerebrósidos se encuentran comúnmente en los tejidos neurales y son el principal glucoesfingolípidos en el cerebro. En las plantas, se produce galactosa, como en los mucílagos de la linaza y la remolacha azucarera. El galactano es un polímero de galactosa que se encuentra en la hemicelulosa de las plantas. [12]

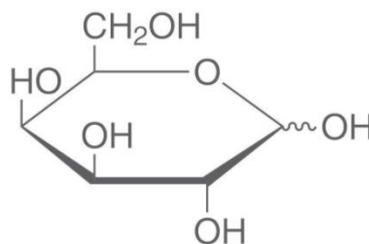


Figura 5 Estructura química cíclica de la D-Galactosa [11]

### 1.1.2. Propiedades químicas de la pectina

Las aplicaciones de la pectina depende de una serie de características físicas y químicas, como el grado de amidación, sensibilidad al calcio, grado de esterificación (% DE) y viscosidad intrínseca (IV). Estos están fuertemente influenciados por las condiciones de extracción, es decir, temperatura, pH y tiempo de extracción. [3]

La fabricación industrial actual de pectina a partir de subproductos generados de materia vegetal y de frutas (como, por ejemplo, la piel de cítricos) mediante diferentes tipos de extracciones generalmente comprende cuatro pasos:

- I) Extracción a partir del material vegetal
- II) Purificación del extracto líquido
- III) Precipitación de la pectina de la solución
- IV) Desesterificación adicional de grupos de éster metílico con ácido, álcali o enzimático dependiendo del perfil de calidad de pectina deseado.

Durante el procesamiento térmico de material vegetal en la extracción pueden ocurrir reacciones catalizadas por enzimas que cambian la solubilidad de la pectina, el tamaño del polímero y el grado de esterificación metílica. Estos cambios pueden tener consecuencias importantes en la calidad del producto. Por ejemplo, reducir el grado de metilesterificación mediante la activación de la actividad de la pectina metilesterasa endógena (PME), da como resultado un material procesado con una textura más firme. Los cambios en las pectinas durante el procesamiento también pueden afectar la calidad de productos como jugos y salsas. [6]

Para seguir los cambios en la pectina que ocurren durante el procesamiento, un método simple para cuantificar las cantidades de pectinas solubles e insolubles consiste en evaluar el grado de metilesterificación (DM). El grado de metilesterificación se define como el porcentaje de grupos carboxilos esterificados con metanol. Esta propiedad varía entre las diferentes especies de frutas y vegetales y a lo largo del tiempo de vida de la especie. [2]

En la industria alimentaria, la pectina se clasifica en bajo metoxilo (LM) y pectinas de alto metoxilo (HM). Las pectinas LM tienen un grado de metilesterificación (DM), por debajo del 50% y típicamente 20-50% (Figura 7), mientras que las pectinas HM tienen un DM superior al 50% y típicamente 50-80% (Figura 6). Las pectinas LM forman geles en presencia de iones divalentes, típicamente a valores de pH en el rango 3-5. La afinidad de la pectina por los iones de Mg es significativamente menor que para los iones Ca, Sr y Ba. El mecanismo de formación de gel para la pectina LM ha sido descrito por "egg box" (Figura 8). Se propuso que las cadenas lineales de (1,4) están unidas a residuos de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico, en el caso de la pectina y el enlace (1,4). Esto da lugar a una cadena que facilita la coordinación de los iones  $Ca^{2+}$  a través de los átomos de oxígeno del anillo de piranosa, además de la interacción electrostática con los grupos de ácido urónico que facilita la reticulación de las cadenas de polisacáridos. Sin embargo, se llegó a la conclusión de que el modelo "egg box" no describe adecuadamente la gelificación de pectina. [13]

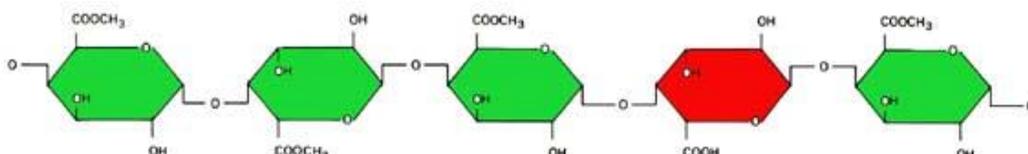


Figura 6 Pectina de alto metoxilo (HM) [14]

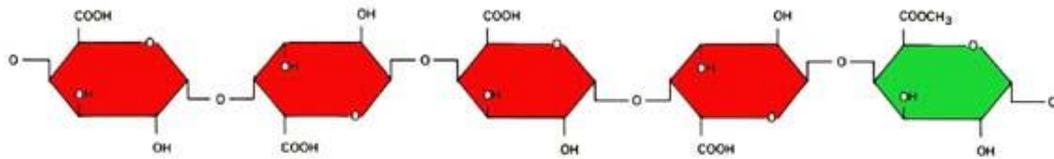


Figura 7 Pectina de bajo metoxilo (LM) [14]

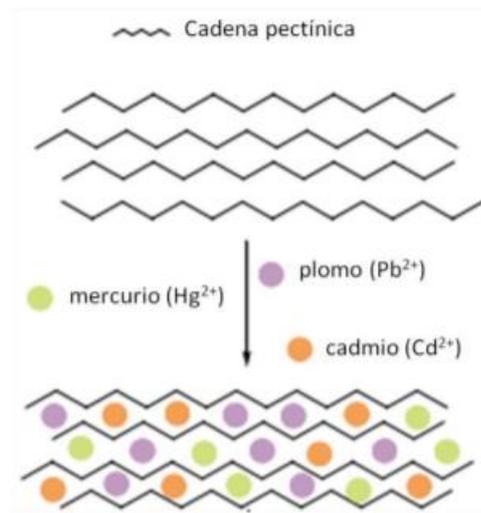


Figura 8 Estructura caja de huevos o "egg box" [14]

Hay varios métodos disponibles para cuantificar y caracterizar pectina. Lo más común es realizar una preparación para aislar el material que contiene la pared celular, generalmente mediante precipitación con etanol, para separar moléculas solubles que interferirían con el posterior análisis. Este residuo insoluble en alcohol se extrae secuencialmente con agua, quelantes y finalmente pH alto para producir fracciones que contienen cada una porción del material péptico total. Estas fracciones pueden entonces ser hidrolizadas y analizadas para determinar su contenido en metanol, ácido urónico, y contenido de azúcares neutros. Los resultados se expresan como las cantidades de estos constituyentes por cantidad de residuo insoluble en alcohol. Suponiendo que la precipitación de pectina por el alcohol es cuantitativa, y que el rendimiento de alcohol es el residuo insoluble por cantidad de material vegetal, puede calcularse la cantidad de pectina en el material vegetal. [6] La pectina extraída se somete a continuación a procesos de hidrólisis ácidas o enzimáticas para provocar la desesterificación y así descomponer la pectina a sus productos más básicos, permitiendo entonces la caracterización de ácidos urónicos, monosacáridos y el grado de esterificación.

Existen dos formas de hidrólisis ácida, una fuerte y otra diluida. La primera emplea ácidos minerales como sulfúricos, clorhídricos, etc. de altas concentraciones a temperaturas inferiores a 100 °C, lo que permite disolver la pectina, la celulosa y la hemicelulosa a sus monosacáridos más simples. El inconveniente es que es necesario hacer uso de material anticorrosivo y que es necesario recuperar el ácido para no dañar el medioambiente. Una hidrólisis ácida diluida permite no romper la estructura cristalina a temperaturas inferiores a 100 °C de compuestos químicos que no posean una estructura amorfa, siendo estas últimas el objetivo de ataque de la hidrólisis, como son las hemicelulosas o pectinas. [15]

Por otro lado, existen las hidrólisis enzimáticas, que consisten en hacer hidrólisis usando enzimas hidrolasas. Las condiciones de operación son suaves, y en contraste con la hidrólisis ácida no genera productos de degradación ni de corrosión, solo genera los monosacáridos, pero puesto que necesita grandes cantidades de enzimas encarecen el proceso y para favorecer el proceso enzimático el producto debe someterse a un pretratamiento. [15]

Dado que tanto la hidrólisis de la pectina y la reacción con m-hidroxidifenilo ocurre en ácido sulfúrico concentrado, es posible un procedimiento rápido y sencillo para cuantificar el contenido de ácido urónico de la pectina, al mismo tiempo que existen mejoras para reducir la interferencia por azúcares neutros. Un enfoque diferente es hidrolizar enzimáticamente la pectina a ácido galacturónico utilizando mezclas de enzimas degradantes de pectina. El contenido de ácido galacturónico puede determinarse posteriormente colorimétricamente. [6]

El análisis de monosacáridos neutros se realiza habitualmente mediante cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida o electroforesis capilar. El método tradicional para cuantificar los monosacáridos neutros ha sido siempre la espectrometría de masas con cromatografía de gases, utilizando como fuente de iones el impacto electrónico (EI). Sin embargo, la preparación de muestras para GC es un proceso extenso, que implica la derivatización de azúcares con reactivos especiales para hacerlos más volátiles. Además, los sensibles parámetros cromatográficos para GC no son adecuados para una rutina de análisis. HPLC se usa comúnmente para determinar la composición de carbohidratos en varios tipos de muestras. Los monosacáridos u oligosacáridos no pueden detectarse directamente por absorción debido a la falta de cromóforos en su estructura molecular, lo que también limita los modos de detección por HPLC. Por ejemplo, los detectores ópticos no satisfacen las demandas del análisis moderno y el detector de índice de refracción tiene una sensibilidad baja, mientras que el uso del detector de dispersión de luz por evaporación tiene un costo elevado [16].

Existe una diversidad de propiedades de la pectina que son posibles de caracterizar gracias a una amplia diversidad de métodos. En la *Tabla 1* se mostrará una tabla resumen donde aparecen las diversas caracterizaciones y las metodologías aplicables.

**Tabla 1: Metodologías aplicables a las diferentes propiedades de la pectina**

<b><u>Propiedad a determinar</u></b>	<b><u>Metodologías</u></b>	<b><u>Referencias Bibliográficas Ejemplos</u></b>
Azúcares totales	Hidrólisis ácida fuerte/enzimática + HPLC Hidrólisis ácida fuerte/enzimática + Cromatografía gases Colorimetrías por absorbancia en UV-Vis	[13], [17], [18]
Ácidos Urónicos	Colorimétricas por absorbancia en UV-Vis Valoraciones ácido-base Hidrólisis ácida fuerte+ HPLC Hidrólisis ácida fuerte+ Cromatografía gases	[19], [13],[4]
Azúcares monoméricos neutros	Hidrólisis ácida fuerte+ HPLC Hidrólisis ácida fuerte + Cromatografía gases	[13], [17]

Grado de esterificación	FTIR Valoraciones acido-base	[13], [20], [21], [28]
Peso molecular	Cromatografía permeación gel IR+MALLS (multi-angle laser- light scattering) HPLC	[13],[20],[21],[22]
Propiedades reológicas	Reometría	[13], [20]
Capacidad antioxidante	FRAP <sup>1</sup> DPPH <sup>2</sup> ABTS <sup>3</sup>	[20], [2]
<sup>1</sup> Reactivo FRAP: buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) y FeCl <sub>3</sub> <sup>2</sup> Reactivo DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo <sup>3</sup> Reactivo ABTS: 2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)		

## 1.2. Aplicaciones de la pectina

En las industrias alimenticia y farmacéutica los hidrocoloides naturales se utilizan ampliamente como espesante, estabilizante, gelificante, reemplazante de grasas, emulsionante y agentes encapsulantes de compuestos bioactivos. El reemplazo o reducción de aditivos sintéticos en alimentos y cosméticos con hidrocoloides naturales ha recibido bastante interés y es más atractivo para la salud de los consumidores. Como resultado, la exploración y caracterización de fuentes de hidrocoloides naturales ha sido objeto de gran atención durante los últimos años y uno de los heteropolisacáridos más estudiados en las últimas décadas es la pectina natural, que ofrece una gran variedad de ventajas y aplicaciones. [20]

En el metabolismo humano, la pectina se combina con el colesterol en el tracto gastrointestinal y reduce la proporción de asimilación de glucosa mediante la captura de carbohidratos ya que la pectina es una fibra dietética soluble en agua. Además de las capacidades antioxidantes que ofrece, también la pectina ofrece propiedades antitumorales, antiulcerosas, anticancerígenas y antimicrobiológicas, disminución del colesterol y cicatrización de heridas [22] [23]

Distintas propiedades de las pectinas como su presencia ubicua en el reino vegetal, bajo coste, flexibilidad estructural y propiedades polimerizantes potencian su aplicación en matrices de captura y materiales de envasado de alimentos activos en la industria. Se ha descubierto que la pectina tiene una débil propiedad inherente antimicrobiana, cuyo potencial antimicrobiano puede potenciarse integrándolos y amalgamándolos con varios compuestos funcionales como aceites esenciales, compuestos fenólicos, nanomateriales, ácidos grasos libres y otros compuestos bioactivos. [24]

Uno de los propósitos de varias investigaciones actuales consisten en crear películas comestibles que promueven la innovación de envases biodegradables para sustituir los envases que han sido formados por productos petroquímicos [25]. Al mismo tiempo, se tiene como objetivo obtener películas comestibles mecánicamente fuertes con otras propiedades deseadas, como baja humedad de absorción y tasa de transferencia de vapor de agua (WVTR). Es deseable porque un WVTR bajo puede prevenir la absorción de humedad del producto alimenticio de un ambiente de alta humedad que posiblemente podría aumentar la actividad del agua del producto alimenticio. El bajo WVTR también puede prevenir la deshidratación de productos alimenticios cuando se almacenan en un ambiente de baja humedad. Por lo tanto, esta propiedad puede prolongar la vida útil de los alimentos. [25]

## 2. Objetivos

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es poner a punto diferentes métodos de ensayos que permitan determinar parámetros de caracterización de pectina comercial y extraídas a partir de residuos agroindustriales.

Para alcanzar este objetivo, se plantea los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una revisión bibliográfica para determinar cuáles son los principales métodos que se utilizan para caracterizar las propiedades de la pectina.
- Poner a punto diferentes métodos para determinar parámetros tales como los azúcares totales, monosacáridos neutros, ácido galacturónico y el grado de esterificación, y comparar los resultados obtenidos para seleccionar aquellos que resulten más adecuados.
- Realizar una validación de los métodos atendiendo a propiedades tales como intervalo de linealidad, linealidad de respuesta y precisión según las directrices de la IUPAC.
- Aplicar los métodos desarrollados para caracterizar una muestra de pectina extraída a partir de pulpa de remolacha

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Materiales y equipo

Para el desarrollo de todo el trabajo experimental, se utilizó el siguiente material:

- **Agitador Magnético** Agimatic -N. P Selecta
- **Agitador Magnético** Micro Stirrer. Velp Scientifica
- **Agitador Vortex** Mixer Gilson
- **Autoclave** Autestes ST. P Selecta
- **Balanza** Gram Precisión. Serie SV
- **Balanza** Sartorius MC 1 Analytic Ac 210 S
- **Baño de agua** P Selecta Ultraterm
- **Centrífuga** MiniSpin eppendorf
- **Centrífuga** Sorvall Legend RT+ Centrifuge. Thermo Scientific
- **Cubetas de cuarzo**
- **Desecador**
- **Digestor** Multiplaces. P Selecta
- **Equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC):**
  - **Bomba isocrática** Waters 1515 Isocratic HPLC Pump
  - **Columna cromatográfica** Aminex HPX-87H
  - **Desgasificador "In-Line"** Waters In-Line Degasser AF
  - **Detector de índice de refracción** Waters 2414 Refractuve Index Detector
  - **Inyector/Muestreador automático con horno** Waters 2707 Autosampler
- **Equipo de rotavapor:**
  - **Bomba de vacío** Vacuubrand MZ 2C NT
  - **Manta calefactora** PCE-HM 250
  - **Rotavapor** Heidolph VV2000
- **Espectrofotómetro** UV-VIS mini 2240 Shimadzu
- **Espectrofotómetro Doble Haz** UV-VIS 2550 Shimadzu
- **Filtros de jeringa para HPLC** NY 0.2  $\mu\text{m}$  [Branchia]
- **Material de vidrio de laboratorio** de uso general
- **Micropipetas** BioPette Plus (1-10 mL, 1-5 mL, 100-1000  $\mu\text{L}$  y 20-200  $\mu\text{L}$ )
- **Papel de filtro** 20  $\mu\text{m}$  [Filter-Lab]
- **pH-metro** pH-meter Basic 20+. Crison
- **Softwares de cálculo** Microsoft Excel y Statgraphics 18
- **Viales de vidrio (2 mL)** para inyección cromatográfica.
- **Viales Eppendorf (2 mL)**

### 3.2. Reactivos

- 3-fenilfenol [Sigma]
- Acetato sódico trihidratado [Panreac]
- Ácido clorhídrico 37% [Panreac]
- Ácido D-Galacturónico monohidratado [Sigma-Aldrich]
- Ácido Sulfámico [Sigma]
- Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 96% para análisis [Panreac]
- Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 72% para análisis [Panreac]

- Ácido Trifluoroacético [Sigma]
- Agua destilada tipo II
- Antrona [Sigma]
- Cloruro sódico [Panreac]
- D (+) – Galactosa Biochemica [Panreac]
- D (+) – Glucosa anhidra [Panreac]
- Enzima Viscozyme [Novozymes]
- Etanol 96% para análisis [Panreac]
- Fenol 90% [Panreac]
- Fenolftaleína
- Hidróxido sódico lentejas para análisis (Reag. USP) [Panreac]
- Hidróxido Potásico al 85% lentejas [Panreac]
- Tetraborato sódico (Borax) anhidro [Panreac]
- L (+) – Arabinosa [Panreac]
- L – Ramnosa [Sigma]
- Pectina de manzana [Sigma]
- Pectina en polvo [Special Ingredients, (comprada por Amazon)]
- Reactivo de Folin-Ciocalteu para diagnóstico clínico [Panreac]
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado [Panreac]

### 3.3. Disoluciones

- **Disolución de hidróxido sódico, 5 % (p/v):** En un vaso de precipitado se pesan 0,5 g de hidróxido sódico. Se añade aproximadamente 20 mL de agua destilada para disolver la masa y se ajusta el volumen a 100 mL. *Se utiliza en la determinación del contenido en ácido galacturónico según el método de Melton-Smith*
- **Disolución de m-Hidroxifenil:** Se pesan 0,15 g de 3-fenilfenol en un vaso de precipitado de 100 mL, se disuelven en < 100 mL de la disolución de 0,5 % (p/v) de hidróxido de sodio y se ajusta a un volumen final de 100 mL con esta disolución. Esta disolución se conserva en una botella opaca o envuelta en papel de aluminio a 4°C. Estable durante aproximadamente 1 mes. *Se utiliza en la determinación del contenido en ácido galacturónico según el método de Filisetti-Cozzi y Carpita y el método de Melton-Smith.*
- **Disolución de tetraborato sódico (Bórax), 75 mM:** Se preparan 100 mL de disolución 75 mM pesando 1,501 g de tetraborato sódico en un vaso de precipitado de 100 mL y se añade aproximadamente 90 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agita hasta disolver todo y se ajusta hasta los 100 mL con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Se utiliza en la determinación del contenido en ácido galacturónico según el método de Melton-Smith*
- **Disolución de ácido sulfámico/sulfamato potásico, 4 M (pH 1.6):** Se pesan 38,84 g de ácido sulfámico y se agita en 50 mL de agua. Se añade hidróxido potásico saturado hasta que el ácido sulfámico se haya disuelto. Se deja enfriar la disolución y se ajusta con cuidado a pH 1,6 con hidróxido sódico saturado. Se ajusta el volumen a 100 mL con agua destilada para dar una concentración final de 4 M. *Se utiliza en la determinación del contenido en ácido galacturónico según el método de Melton-Smith*
- **Disolución de sulfato de cobre, 10 mM (pH 4.8):** Se pesan 23,2 g de NaCl y 3,2 g de acetato sódico, se mezclan con 1,0 mL de ácido acético glacial y 80 mL. Se ajusta el pH a 4,8 con hidróxido sódico y se ajusta el volumen final a 100 mL con agua destilada. Esta disolución es estable durante semanas a temperatura ambiente. *Se utiliza en la determinación del contenido en ácido galacturónico según el método de Anthon-Barret*

- **Disolución de reactivo de Folin-Ciocalteu:** 1 mL de una disolución concentrada de Folin-Ciocalteu se mezcla con 39 mL de agua destilada. *Se utiliza en la determinación del contenido en ácido galacturónico según el método de Anthon-Barret*
- **Disolución buffer de acetato 25 mM (pH 4.8):** Se prepara la disolución pesando 0,06 g de acetato sódico y cogiendo 0,03 mL de ácido acético, ambos se mezclan con 40 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 4,8 con HCl o NaOH y se añade agua hasta 50 mL. *Se utiliza en la determinación del contenido en ácido galacturónico según el método de Anthon-Barret*
- **Disolución de fenol al 5%:** Se mezclan 27,5 mL del reactivo de fenol al 90% en 500 mL de agua destilada. Preparar en campana extractora. *Se utiliza en la determinación del contenido de azúcares totales según el método del reactivo fenol-sulfúrico.*
- **Disolución de antrona- ácido sulfúrico:** Se disuelven 0,2 g de Antrona en 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96%. El reactivo puede usarse durante 3-4 días y debe conservarse a 0 °C y sin contacto directo de luz. *Se utiliza en la determinación del contenido de azúcares totales según el método del reactivo antrona*
- **Disolución 0.1 N HCl:** Se diluyen 0,828 mL de HCl al 37% en 100 mL de agua. *Se utiliza en la determinación del grado de esterificación*
- **Disolución 0.1 N NaOH:** Se disuelven 0,39 g de NaOH en 100 mL de agua. *Se utiliza en la determinación del grado de esterificación*

### 3.4. Análisis estadístico de los resultados

Para validar los diferentes métodos evaluará los siguientes parámetros y se realizará un estudio estadístico usando los siguientes softwares informáticos:

- Microsoft Excel
- Statgraphics 18

A continuación, se nombrarán los siguientes parámetros, de acuerdo con las directrices de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). Cada determinación se realizó, como mínimo, por duplicado:

- Intervalo de linealidad
  - Límite de Detección (LOD)
  - Límite de Cuantificación (LOQ)
  - Límite de Linealidad (LOL)
- Linealidad de respuesta
- Precisión
  - Repetibilidad
  - Reproducibilidad

### 3.5. Métodos

Para la caracterización de la pectina y la determinación cuantitativa de los diferentes parámetros, se aplicaron diferentes metodologías experimentales basadas en los documentos que se encuentran en la bibliografía.

#### 3.5.1. Determinación de ácido galacturónico

Las medidas cuantitativas del ácido galacturónico normalmente se determinan por metodologías colorimétricas después de ser hidrolizadas por ácidos fuertes. Sin embargo, esta metodología implica además la degradación de azúcares neutros y otros compuestos que se

hidrolizan con los ácidos, interfiriendo en la determinación colorimétrica del ácido galacturónico.

Este problema puede solucionarse aplicando la metodología desarrollada por Filisetti-Cozzi y Carpita [26], que previene la turbidez que ocurre durante el calentamiento de los azúcares en medio ácido sulfúrico concentrado y evita la formación adicional de otros interferentes. Por ello, se realizará la caracterización de la pectina según esta metodología, y además se aplicarán otros dos ensayos basados en la metodología descrita por Melton y Smith [19], que replican los ensayos de Filisetti-Cozzi y Carpita, además de realizar una hidrólisis previa según la metodología de Ahmed y Labavitch [27]. Se realizarán dos tipos de ensayos, donde el primero consistirá en aplicar una hidrólisis ácida fuerte previa de las paredes celulares para las muestras de pectina extraídas de la pulpa de remolacha y también en las muestras comerciales de pectina según la metodología de Melton-Smith y Filisetti-Cozzi y Carpita, y otro en la que se realizará una hidrólisis enzimática según la metodología de Anthon-Barret. En la *Tabla 2* aparece un resumen de las metodologías, los tipos de hidrólisis que se aplican en cada una de ellas y el tipo de muestra de pectina que se va a analizar.

*Tabla 2 Clasificación de metodologías para la determinación de ácido galacturónico según su tipo de hidrólisis y tipo de muestra*

<b>Tipo de Hidrólisis</b>	<b>Metodología</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Tipo de muestra de pectina</b>
Hidrólisis ácida fuerte	Melton-Smith [19]	<u>Temperatura:</u> 95°C <u>Tipo ácido:</u> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 96% <u>Tiempo hidrólisis:</u> 20 minutos	Pectina comercial Pectina extraída de pulpa
	Filisetti-Cozzi y Carpita [26]	<u>Temperatura:</u> 100°C <u>Tipo ácido:</u> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 96% <u>Tiempo hidrólisis:</u> 20 minutos	Pectina comercial
Hidrólisis Enzimática	Anthon-Barret [6]	<u>Temperatura:</u> 30°C <u>Tipo enzima:</u> <u>Viscozyme</u> [Novozymes] <u>Tiempo hidrólisis:</u> 24 horas	Pectina comercial

### *3.5.1.1. Determinación del contenido en ácido galacturónico según la metodología de Filisetti-Cozzi y Carpita.*

Inicialmente se toman 25 mg de muestra de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients) y se disuelven con 50 mL de agua destilada. A partir de esta disolución madre de pectina se elaboran disoluciones de pectina de concentración de 10-40-80 mg/L (ppm) por duplicado. También se prepara una recta de calibración a partir de una dilución madre de ácido galacturónico patrón. Para preparar dicha dilución se toman 50 mg de ácido galacturónico patrón y se diluyen en 100 mL de agua destilada. Las concentraciones de la recta de calibración serán 1-10-20-30-40-60-80

ppm, sin incluir el blanco, el cual será elaborada con agua destilada y el resto de reactivos de la metodología.

A 0,4 mL de las diluciones de muestras de pectinas comerciales se le añaden 2,4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se calientan en un baño maría a aproximadamente 100 °C durante 20 minutos en tubos de ensayo. A continuación, los tubos de ensayo se enfrían en un baño de agua con hielo durante, aproximadamente, 15 minutos y posteriormente se añaden 150 µL de una disolución de m-hidroxifenil, tras lo cual se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos y finalmente se realiza la medición de absorbancia a 525 nm [26]. A partir de la absorbancia se puede calcular la concentración de ácido galacturónico que contiene la pectina, cuyo resultado se expresara en miligramos de ácido galacturónico contenidos en 1 gramos de pectina

### 3.5.1.2. *Determinación del contenido en ácido galacturónico según la metodología de Melton-Smith*

En primer lugar, se realiza la hidrólisis ácida de las paredes celulares de las muestras de pectina extraída de la pulpa de remolacha y de muestras de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients) según el método de Ahmed y Labavitch [27]. Se pesan 5 mg de muestra en vasos de precipitados y se añade 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, luego se tapan. Estos tubos de ensayo se colocan en un baño de agua-hielo y se agitan durante 5 minutos. Para ello se utilizan agitadores magnéticos.

Se vuelve a añadir 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se agita durante 5 minutos sobre el baño de agua-hielo. Se añaden 0.5 mL de agua y se agita durante 5 minutos. Se repite el proceso por segunda vez. A continuación, se diluye el contenido de cada vaso en 10 mL de agua. Se transfieren 2 mL de esta última mezcla a tubos Eppendorf y se centrifugan a 2000 g durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

Las alícuotas de los líquidos sobrenadantes o de muestras de pectinas diluidas (400 µL) son recogidas en tubos de ensayo de vidrio. Se añaden 40 µL de la mezcla 4M de ácido sulfámico y solución de sulfamato potásico a pH 1,6. Se realiza una agitación Vortex a los tubos.

Se añaden 2,4 mL de la disolución de 75 mM tetraborato de sodio en ácido sulfúrico y se vuelven a realizar la agitación por Vortex. Se colocan los tubos en un baño María a 95 °C durante 20 minutos, y luego se enfrían los tubos de ensayo en un baño de agua-hielo durante 10 minutos. Los tubos de ensayo deben ser tapados para evitar la condensación de agua en el interior del tubo.

Por último, se añaden 80 µL de la disolución de m-hidroxidifenil a cada uno de los tubos de ensayo que contienen los patrones, las muestras y los blancos. Se utiliza el agitador Vortex tres veces por cada tubo y al cabo de 10 minutos se procede a la lectura de la absorbancia a 525 nm de cada una de las disoluciones, procurando no tardar más de 30 minutos en total, puesto que tras pasar ese tiempo la lectura puede ser errónea debido a la pérdida de la intensidad del color.

Para realizar la recta de calibración con patrones de ácido D-galacturónico se prepara una disolución madre de 20 mg/mL pesando 20 mg de ácido D-galacturónico deshidratado y se disuelve en 1 mL de agua destilada. A continuación, se prepara una solución de 200 µg/mL tomando 100 µL de la disolución madre y se añade 9900 µL de agua. A partir de esta disolución se prepara una serie de diluciones que aparecen en la *Tabla 3* [19]:

**Tabla 3 Series de diluciones para el patrón de ácido galacturónico para la metodología de Melton-Smith [14]**

<b>Concentración de ácido galacturónico (<math>\mu\text{g}/400\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen de la disolución de ácido galacturónico 200 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen de agua (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
5.0	125	1875
10.0	250	1750
15.0	375	1625
20.0	500	1500
30.0	750	1250
40.0	1000	1000

### *3.5.1.3. Determinación del contenido en ácido galacturónico según la metodología de Anthon-Barret*

Como en otros ensayos, se preparan disoluciones de las muestras de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients). Para ello se toman 25 mg de las muestras de pectina y se diluyen con 50 mL de agua destilada. A partir de esta disolución madre se prepara 3 diluciones de diferentes concentraciones (50-100-150 ppm) en matraces de 10 mL. Se trabajará con estas disoluciones. Para la elaboración de una recta de calibración se pesan 50 mg de ácido galacturónico patrón y se mezcla con 100 mL de agua destilada. A partir de esta disolución madre se preparan las siguientes concentraciones para la calibración: 10-25-50-75-100-125-150 ppm.

Inicialmente es necesario realizar una hidrólisis enzimática de la pectina. Para ello se toma una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de las muestras y se mezcla con 600  $\mu\text{L}$  del buffer de acetato 25 mM. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de la enzima Viscozyme y se incuban durante 24 horas a 30°C. Tras la hidrólisis, de la mezcla resultante se toman 100  $\mu\text{L}$  y se diluyen con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ .

Las muestras se llevan a tubos de ensayo (200  $\mu\text{L}$ ) y se mezclan con 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de sulfato de cobre 10 mM pH 4,8. La mezcla resultante se calienta a 95 °C en un baño maría durante 40 minutos. Los tubos de ensayo deben estar tapados para evitar cualquier tipo de condensación de agua externa y de evaporación de agua que contiene la mezcla, para no alterar el volumen final. Mientras se calientan las muestras, se prepara la disolución del reactivo de Folin-Ciocalteu. Tras finalizar el tiempo de calentamiento se añaden a las muestras 1.6 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu previamente preparado. Finalmente se miden los valores de absorbancia a 750 nm.

### *3.5.2. Determinación de azúcares totales*

Los carbohidratos son biomoléculas que tienen una gran importancia en el campo de la investigación de las ciencias de la vida y en la aplicación industrial. Existe una variedad de métodos colorimétricos los cuales utilizan reactivos distintos como antrona, fenol, orcinol o resorcinol, siendo los dos primeros los reactivos mayoritariamente usados en la determinación de azúcares totales. Todos los carbohidratos tanto oligosacáridos como polisacáridos pueden ser determinados, pues bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos.

La adición de algunos ácidos minerales a las soluciones acuosas de carbohidratos, como el ácido sulfúrico, provoca la deshidratación de los carbohidratos con la eliminación de tres moles de agua. Con esta reacción se forman derivados del furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF). En el caso de las pentosas, se produce una deshidratación a furfural y de las hexosas a HMF.

La presencia de fenol y su interacción con el HMF facilita la formación de complejos que permiten la coloración de la solución y en consecuencia facilitan la cuantificación de los carbohidratos a través de espectrofotometría. Sin embargo, la cuantificación con antrona es limitada puesto que este reactivo es inestable debido a su degradación y el consecuente oscurecimiento de la solución que altera la lectura colorimétrica, además de presentar una menor capacidad en el análisis de polisacáridos conformados por mezcla de azúcares. [18]

#### *3.5.2.1. Determinación de azúcares totales mediante el método del reactivo fenol-sulfúrico*

Se pesan 50 mg de muestras de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients) y se diluyen en 50 mL de agua destilada. A partir de esta disolución madre se preparan 3 disoluciones de concentraciones 20-50-80 mg/L o ppm de las muestras de pectina comercial. Tomamos 2 mL de muestra y las depositamos en tubos de ensayo de vidrio, se agrega 1 mL de la solución de fenol al 5% y posteriormente se agregan 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96% procurando agregarlo en el menor tiempo posible entre las diferentes muestras y patrones. Los tubos de ensayo se dejan enfriar durante 10 minutos, seguido de agitación durante 10 segundos y finalmente se dejan reposar los tubos en un baño de agua a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se mide la absorbancia a 490 nm. [18] Se utilizará como patrón para la recta de calibración D-Glucosa, ya que es el producto mayoritario disponible en pectina y este se transforma en 5-hidroximetilfurfural (HMF) en presencia de ácidos minerales. Esta transformación ocurrirá con todas las hexosas, por lo que la coloración ocurrirá debido a la presencia del fenol (debido a la combinación del fenol con el HMF) y será cuantificable el azúcar total.

Para la preparación de los patrones se toman 50 mg de Glucosa patrón y se mezclan con 100 mL de agua destilada. A partir de esta disolución madre se elabora las concentraciones para realizar la recta de calibración, siendo las concentraciones: 10-20-30-40-50-60-70 ppm. Además, para el blanco se utilizará agua destilada y el resto de reactivos del ensayo.

#### *3.5.2.2. Determinación de azúcares totales mediante el método del reactivo antrona*

Se pesan 50 mg de muestras de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients) y se diluyen en 50 mL de agua destilada. A partir de esta disolución madre preparamos 3 disoluciones de concentraciones 20-50-80 mg/L o ppm de las muestras de pectina comercial. Se agregan 1 mL de muestra a un tubo de ensayo de vidrio y a continuación se añade 2 mL del reactivo de antrona-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se agitan los tubos de ensayo en el agitador Vortex para homogenizar la mezcla y se deja reposar durante 2 minutos en un baño de agua-hielo. Posteriormente se incuban a 100 °C durante 10 minutos en un baño maría. Se deja reposar los tubos en un baño de agua fría hasta que se alcanza la temperatura ambiente (aproximadamente 5 minutos) y se mide la absorbancia de las muestras a 625 nm. Al igual que en el método del reactivo fenol-sulfúrico, la antrona se combina con el HMF, producto de la deshidratación de las hexosas por la presencia de los ácidos minerales.

Para la preparación de los patrones se toman 50 mg de Glucosa patrón y se mezclan con 100 mL de agua destilada. A partir de esta disolución madre se elabora las concentraciones para realizar la recta de calibración, siendo las concentraciones: 10-20-30-40-50-60-70 ppm. Además, para el blanco se utilizará agua destilada y el resto de reactivos del ensayo.

### 3.5.3. Determinación de azúcares neutros mediante HPLC

Para el análisis de monosacáridos neutros se hace uso del equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) nombrado en el apartado 3.1. "Materiales y reactivos" con las condiciones cromatográficas que aparecen en la *Tabla 4*:

**Tabla 4 Condiciones cromatográficas para HPLC**

<b>Volumen de inyección</b>	20 µL
<b>Temperatura columna</b>	60 °C
<b>Fase móvil</b>	0.01 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Flujo fase móvil</b>	0.6 mL/min
<b>Columna cromatográfica</b>	Aminex HPX-87H

El equipo estaba preparado perfectamente para realizar análisis de azúcares monoméricos. A pesar de que el detector de índice de refracción presenta baja sensibilidad ante el análisis de múltiples monosacáridos, es lo suficientemente capaz de detectar los siguientes azúcares con los que se trabajará: D (+)-Glucosa, D (+)-Galactosa, L (+)-Arabinosa, L-Ramnosa y D-Ácido Galacturónico.

Puesto que la pectina es un heteropolisacárido compuesto básicamente por D (+)-Glucosa, D (+)-Galactosa, L (+)-Arabinosa, L-Ramnosa y D-Ácido Galacturónico es necesario realizar una hidrólisis para poder romper la estructura de la pectina y obtener los monosacáridos pertinentes. Una hidrólisis en medio ácido y en caliente permite no solo realizar extracciones de pectina, si no también permite romper los enlaces químicos de los monosacáridos que componen la pectina. Para ello, los ácidos más usados son el ácido sulfúrico y ácido trifluoroacético [22]

#### 3.5.3.1. Hidrólisis ácida de pectina con ácido trifluoroacético

A 10 mg de las muestras de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients) se le añaden 20 mL de ácido trifluoroacético 20 M. La disolución resultante se incuba durante 4 horas a 85°C en un sistema de digestión. Tras finalizar la digestión, se dejan enfriar las muestras y se centrifugan a 2500 g durante 15 minutos.

A continuación, se utiliza un rotavapor para eliminar el ácido trifluoroacético. Cuando quede poca cantidad de disolución, se recupera con 10 mL de agua destilada y se continúa eliminando los restos del ácido. Una vez alcanzado el volumen de agua de recuperación de los azúcares, se filtran las muestras para ser sometidas a un análisis por HPLC. [22]

Para la elaboración de la recta de calibración con patrones de los diferentes monosacáridos neutros que se analizaran (D (+)-Glucosa, D (+)-Galactosa, L (+)-Arabinosa, L-Ramnosa, y D-Ácido Galacturónico.) se prepara una disolución madre de todos los monosacáridos de concentración 50 gramos por litro. Se pesan 1,25 g de los diferentes monosacáridos y se mezclan todos juntos en 25 mL de agua destilada. Para favorecer la disolución utilizar un agitador magnético. A partir de la disolución madre se prepara las siguientes concentraciones, que se utilizaran para las concentraciones de la recta de calibración: 0,01-0,05-0,1-0,5-1-5 g/L.

También se calcularon los porcentajes de recuperación de los diferentes monosacáridos tras ser sometidos a esta hidrólisis. Para ello se realizan 2 disoluciones que contienen los diferentes

monosacáridos patrones mencionados con anterioridad a concentraciones de 1 y 3 g/L de cada azúcar por duplicado. Para ello se pesan 0,020 y 0,060 g de cada monosacárido respectivamente y se diluyen todos juntos en 20 mL de agua destilada. Tanto para las disoluciones patrones que se usan para el cálculo del porcentaje de recuperación como para los patrones que se usan en la elaboración de la recta de calibración es necesario filtrarlos previamente al análisis por HPLC. Los filtros usados aparecen en el *apartado 3.1 “Materiales y reactivos”*.

#### 3.5.3.2. Hidrólisis ácida de pectina con ácido sulfúrico

Se pesan 0,300 g de las muestras de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients) con la mayor exactitud posible en un tubo de ensayo de vidrio y se añaden 3 mL de ácido sulfúrico al 72%. Los tubos se ponen en un baño de agua a 30 °C durante 1 hora. Cada 15 minutos han de agitarse las muestras con ayuda de una varilla de vidrio para facilitar su digestión.

La mezcla se vierte en botellas de vidrio ISO añadiendo 84 mL de agua, procurando arrastrar en su totalidad la muestra de los tubos de ensayo. A continuación, las muestras se hidrolizan en un autoclave a 121 °C durante 59 minutos. Finalizada la hidrólisis, las muestras se colocan en un baño de agua hielo para que se enfríen, después se secan las botellas ISO con las muestras y se vuelven a pesar.

Para la elaboración de la recta de calibración con patrones de los diferentes monosacáridos neutros que se analizaran (D (+)-Glucosa, D (+)-Galactosa, L (+)-Arabinosa, L-Ramnosa y D-Ácido Galacturónico.) se prepara una disolución madre de todos los monosacáridos de concentración 50 gramos por litro. Se pesan 1,25 g de los diferentes monosacáridos y se mezclan todos juntos en 25 mL de agua destilada. Para favorecer la disolución utilizar un agitador magnético. A partir de la disolución madre se prepara las siguientes concentraciones, que se utilizaran para las concentraciones de la recta de calibración: 0,01-0,05-0,1-0,5-1-5 g/L

También se calcularon los porcentajes de recuperación de los diferentes monosacáridos tras ser sometidos a esta hidrólisis. Para ello se realizan 2 disoluciones que contienen los diferentes monosacáridos patrones mencionados con anterioridad a concentraciones de 1 y 3 g/L de cada azúcar por duplicado. Para ello se pesan 0,100 y 0,300 g de cada monosacárido respectivamente y se diluyen todos juntos en 100 mL de agua destilada. Tanto para las disoluciones patrones para el cálculo del porcentaje de recuperación como para los patrones de la recta de calibración es necesario filtrar las muestras previamente al análisis por HPLC. Los filtros usados aparecen en el *apartado 3.1 “Materiales y reactivos”*.

#### 3.5.4. Determinación del grado de esterificación

El grado de esterificación se ha realizado según el método estandarizado USP 26 NF 21, que se recoge en el documento de Gharibzahedi y col. [21]. Se pesan 0,2 g de pectina comercial (Sigma y Special Ingredients) y pectina extraída de la pulpa de remolacha, y se mezclan con 3 mL de etanol 96%. La mezcla resultante se disuelve en 20 mL de agua destilada con una agitación de 150 rpm. Se añaden dos gotas de fenolftaleína a la disolución y se valora con 0.1 M de hidróxido sódico ( $V_1$ ). Luego se añaden 10 mL de NaOH 0.1 M y se agita durante 15 minutos para favorecer la reacción de hidrólisis. A continuación, se añaden 10 mL de ácido clorhídrico 0.1 M y se agita hasta la completa eliminación del color rosado. Las muestras son de nuevo valoradas con NaOH 0.1 M ( $V_2$ ) hasta que aparezca de nuevo el color rosado. El porcentaje de grado de esterificación se calcula según la *ecuación 1*:

$$DE (\%) = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100 \quad (1)$$

DE: Grado de esterificación (%)

$V_1$ =Primer volumen NaOH (mL) usado en la valoración

$V_2$ = Segundo volumen NaOH (mL) usado en la valoración

### 3.5.5. Proceso de extracción de la pectina

La extracción de pectina de la pulpa de remolacha se realiza según la metodología de Adiletta et al. [30].

Se toman 7 g de pulpa de remolacha seca que tenga un tamaño de masa en el rango de 0 a 400  $\mu\text{m}$  y se dispersan con 210 mL de ácido cítrico al 20%. Se ajusta el valor de pH de la suspensión resultante a 1,5 añadiendo 5 gotas de solución de HCl al 20% en peso. Posteriormente, la mezcla se calienta en un baño termostatzado a 90 ° C durante 4 horas. La mezcla se enfría luego a temperatura ambiente y se filtra a través de papel de filtro de 20 micras. El residuo solido se exprime para recuperar el líquido atrapado. El líquido filtrado y el líquido exprimido se recogen y se tratan con tres volúmenes de etanol al 96% (un total de 100 mL) a 4 ° C durante una noche para coagular las pectinas por precipitación alcohólica. El coagulado de pectinas se recupera mediante centrifugación a 2647  $\times$  g y con una duración de 30 minutos. Finalmente se secan las muestras de pectina en una estufa a 50 ° C durante 24 horas hasta un peso constante y luego se pesa. El líquido sobrenadante se recoge para posteriores recuperaciones de etanol.

## 4. Resultados experimentales

### 4.1. Determinación de ácido galacturónico. Validación del método espectrofotométrico.

#### 4.1.1. Linealidad de la respuesta

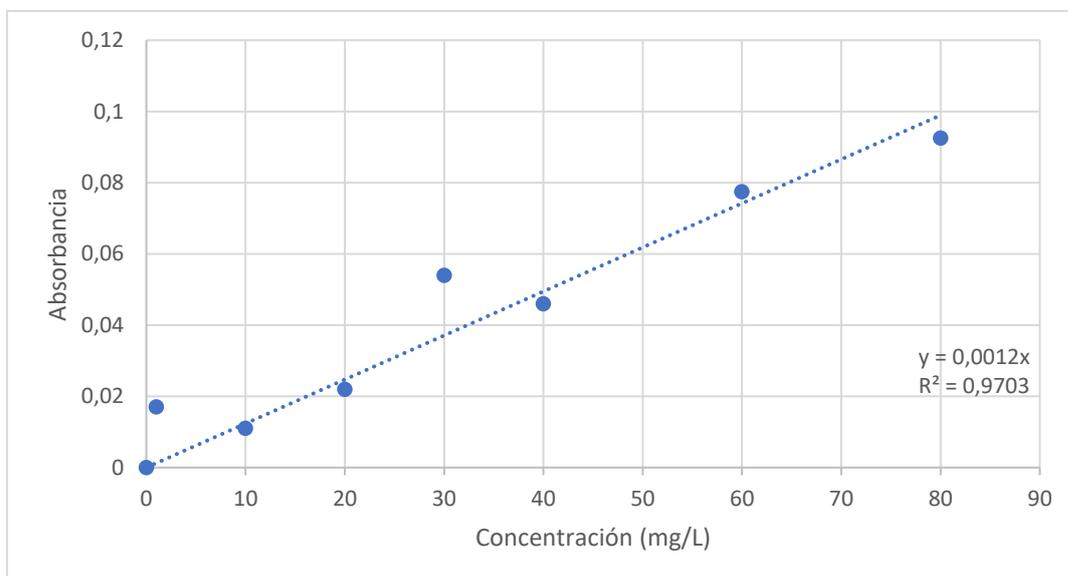
La linealidad de la respuesta se realiza a partir de las correspondientes líneas de calibrado construidas para cada método. Para poder verificar la linealidad se emplea un análisis de varianza (ANOVA). ANOVA es una herramienta estadística que estima la varianza de la falta de ajuste al modelo lineal y la varianza residual, que es causada por la incertidumbre asociada a la obtención de respuestas. Ambas varianzas se comparan mediante una prueba F de Fisher-Snedecor. Las rectas de calibración presentadas a continuación son el resultado del promedio de las rectas de calibración realizadas para el mismo método.

Se realizará un test de hipótesis o prueba de significación mediante la prueba F. Este test permite dos opciones, una hipótesis alternativa donde se establece que las varianzas no son comparables, por lo tanto, el modelo lineal no es el adecuado y se acepta que hay una falta de ajuste; y la otra opción es aceptar una hipótesis nula, donde las varianzas son homogéneas y se establece que el modelo lineal es el adecuado y no hay falta de ajuste.

En el test de hipótesis se comparan los valores de los estadísticos F, calculado como cociente de las varianzas, y el F crítico de una cola (nivel de significación  $\alpha = 0,05$  y grados de libertad oportunos para el estudio). Si el valor de F experimental es menor que el F crítico, se acepta la hipótesis nula. En caso contrario se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, realizando un estudio diferente.

#### 4.1.1.1. Linealidad de respuesta del método de Filisetti-Cozzi y Carpita

En la *Figura 9* se muestra la línea de calibración obtenida para el método de Filisetti-Cozzi y Carpita para la determinación de ácido galacturónico realizada con patrones de ácido galacturónico disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 80 mg/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



*Figura 9 Recta de calibración del método Filisetti-Cozzi y Carpita (n=2)*

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 0,9703$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación debe ser  $R^2 \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método no debería ser aceptable. Para confirmar correctamente que no es válido el método lineal realizamos el análisis ANOVA.

En la *Tabla 5* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crítico}}=3,58$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,08$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crítico}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Por lo tanto, se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

**Tabla 5 Análisis de varianza de la recta de calibración del método de Filisetti-Cozzi y Carpita**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	1,44E-02	1	1,44E-02	12,46	0,0033
Residuo	1,62E-02	14	1,16E-03		
Carencia de Ajuste	9,42E-04	6	1,57E-04	0,08	0,9966
Error Puro	1,53E-02	8	1,91E-03		
Total (Corr.)	3,06E-02	15			

#### 4.1.1.2. Linealidad de respuesta del método de Melton-Smith

En la *Figura 10* se muestra la línea de calibración obtenida para el método de Melton-Smith para la determinación de ácido galacturónico realizada con patrones de ácido galacturónico disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 80 mg/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.

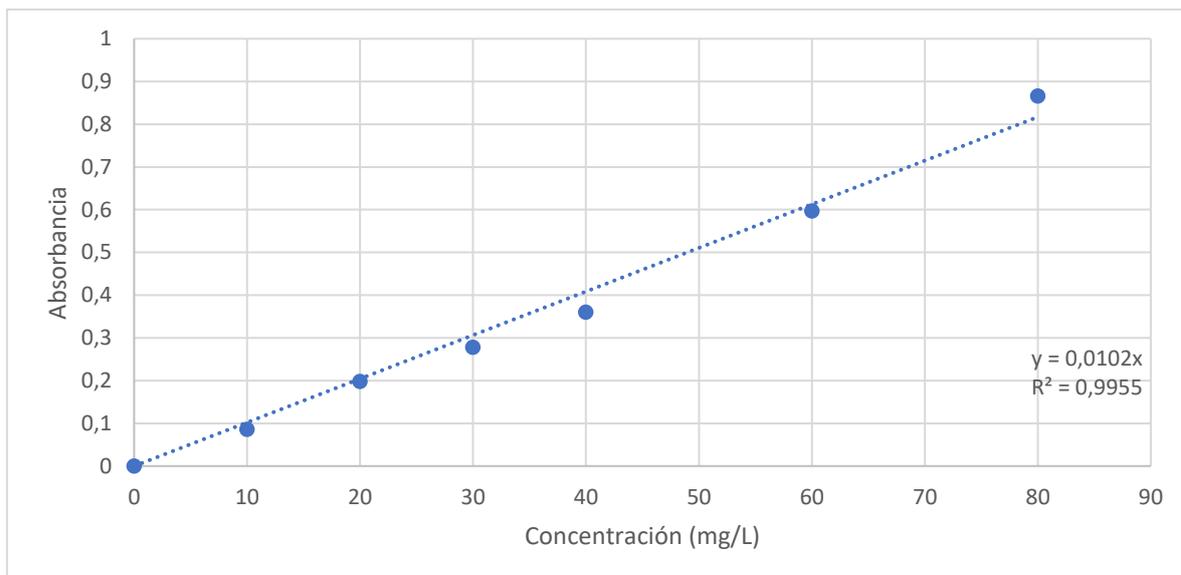


Figura 10 Recta de calibración del método de Melton-Smith (n=5)

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 0,9955$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es aceptable.

En la *Tabla 6* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crit}}=2,53$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,15$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

Tabla 6 Análisis de varianza de la recta de calibración del método de Melton-Smith

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3,26E+00	1	3,26E+00	103,30	0,0000
Residuo	1,26E+00	40	3,15E-02		
Carencia de Ajuste	2,72E-02	5	5,45E-03	0,15	0,9772
Error Puro	1,23E+00	35	3,53E-02		
Total (Corr.)	4,52E+00	41			

#### 4.1.1.3. Linealidad de respuesta del método de Anthon-Barret

En la *Figura 11* se muestra la línea de calibración obtenida para el método de Anthon-Barret para la determinación de ácido galacturónico realizada con patrones de ácido galacturónico disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 150 mg/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.

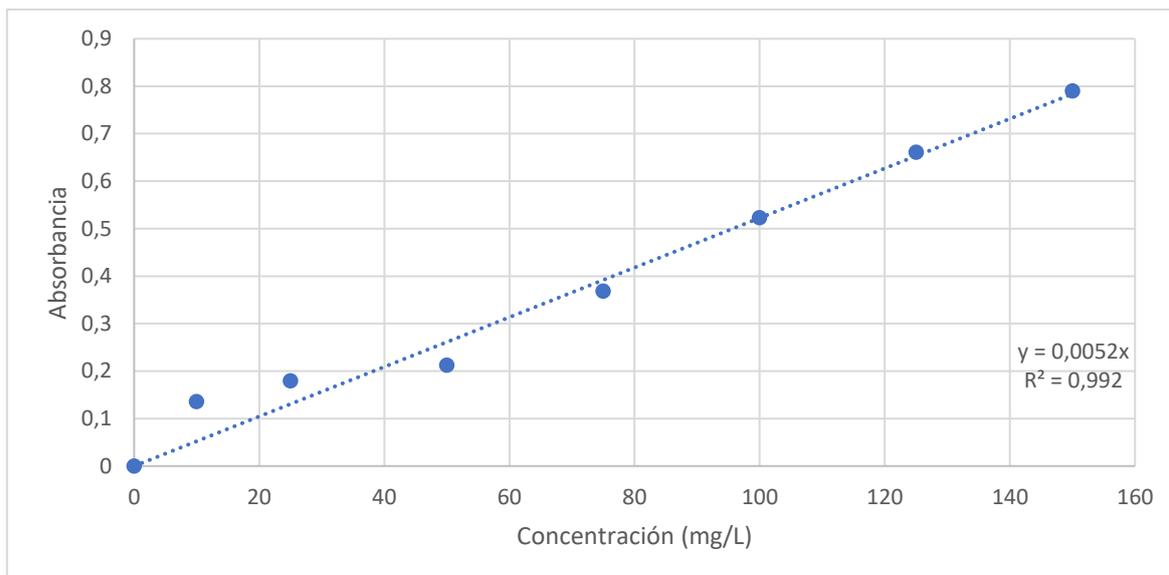


Figura 11 Recta de calibración del método de Anthon-Barret (n=4)

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 0,992$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es aceptable.

En la *Tabla 7* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crit}}=2,51$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,41$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

Tabla 7 Análisis de varianza de la recta de calibración del método de Anthon-Barret

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,10E+00	1	2,10E+00	138,62	0,0000
Residuo	4,55E-01	30	1,52E-02		
Carencia de Ajuste	4,19E-02	6	6,99E-03	0,41	0,8679
Error Puro	4,13E-01	24	1,72E-02		
Total (Corr.)	2,56E+00	31			

#### 4.1.2. Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método espectrofotométrico. Ácido Galacturónico.

El LOD se puede determinar considerando una relación señal/ruido de 3. La *ecuación 2* presenta el cálculo que se aplica para determinar el LOD. El LOQ se puede determinar considerando una relación señal/ruido de 10. La *ecuación 3* presenta el cálculo que se aplica para determinar el LOQ. El LOL se determina cuando se pierde la linealidad de la recta de calibración. Normalmente coincide con el último punto de la recta. En la *Tabla 8* aparecen los resultados de las diferentes metodologías para la determinación de ácido galacturónico.

$$LOD = 3 \times S_{\frac{y}{x}} + \text{ordenada en el origen} \quad (2)$$

$$LOQ = 10 \times S_{\frac{y}{x}} + \text{ordenada en el origen} \quad (3)$$

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

$S_{y/x}$  = Desviación estándar de los residuales de la recta de calibración

**Tabla 8 LOD, LOQ y LOL (concentración en mg/L) de los métodos de la determinación de ácido galacturónico**

Método	LOD	LOQ	LOL
Melton-Smith	8,93	29,77	113,18
Filisetti-Cozzi y Carpica	8,79	24,17	237,16
Anthon-Barret	11,84	39,48	199,30

#### 4.1.3. Precisión de los resultados del método de Filisetti-Cozzi y Carpita.

Para evaluar la precisión de los métodos se realizará un análisis estadístico de las rectas de calibración obtenidas por los diferentes métodos. Se obtendrán diversos parámetros de precisión como el Coeficiente de Variación (CV), la Varianza ( $S^2$ ), la Desviación Estándar Relativa (RSD), la Desviación Estándar (S). Si el coeficiente de variación es próximo al 0%, significa que existe poca variabilidad en los datos y es una muestra muy compacta. En cambio, si tienden a 100% es una muestra muy dispersa y la media pierde veracidad. De hecho, cuando el coeficiente de variación supera el 30% se dice que la media es poco representativa y el método no puede validarse [31].

En la *tabla 9* aparecen los resultados de los parámetros de precisión de la recta de calibración del método de Filisetti-Cozzi y Carpita. Se puede observar que el promedio del CV presenta un valor muy elevado, por lo que se puede asegurar que este método presenta poca precisión.

**Tabla 9 Parámetros de precisión del método de Filisetti-Cozzi y Carpita**

Concentración (ppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coeficiente de Variación (%) (CV)	Varianza ( $S^2$ )
0	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
1	0,016	0,01	0,67	67,16	1,20E-04
10	0,043	0,03	0,70	70,36	9,01E-04
20	0,062	0,03	0,45	44,70	7,68E-04
30	0,131	0,03	0,25	24,62	1,05E-03
40	0,172	0,10	0,55	55,39	9,08E-03
60	0,258	0,11	0,45	44,59	1,32E-02
80	0,357	0,18	0,50	50,25	3,22E-02
	Promedio prametros	0,06	0,45	44,63	7,17E-03

Los resultados del método de Filisetti-Cozzi y Carpita para las muestras de pectinas comerciales preparadas con diferentes concentraciones se presentan en las *tablas 10 y 11*, expresados como miligramos de ácido galacturónico por cada gramo de pectina. Estos resultados se han obtenido al analizar diferentes muestras de pectinas comerciales preparadas a varias concentraciones (10-40-80 ppm) por duplicado en el espectrofotómetro de un solo haz. Se realizan las medias, se calculan los parámetros de precisión y se obtiene un resultado final, expresado en mg de ácido galacturónico/g de pectina.

**Tabla 10 Resultados del método de Filisetti-Cozzi y Carpita de la pectina comercial Special Ingredients**

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 1	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 2
10	2157,89	3368,42
40	1065,79	1539,47
80	907,89	1236,84
	464,29	339,29
	616,07	575,89
	549,11	651,79

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	Media mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
10	1265,98	1451,04	1,15	114,62	2,11E+06
40	759,45	451,79	0,59	59,49	2,04E+05
80	836,41	306,64	0,37	36,66	9,40E+04

Resultado final ácido galacturónico Special Ingredients	Media total mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	953,94	272,96	0,29	28,61	74504,69

**Tabla 11 Resultados del método de Filisetti-Cozzi y Carpita de la pectina comercial Sigma**

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 2	
10	3315,79	4526,32	571,43	178,57
40	1842,11	1144,74	1102,68	1178,57
80	1401,32	1013,16	1127,23	1214,29

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	Media mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
10	2148,03	2112,21	0,98	98,33	4,46E+06
40	1317,02	351,43	0,27	26,68	1,24E+05
80	1189,00	163,76	0,14	13,77	2,68E+04

Resultado final ácido galacturónico Sigma	Media total mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación	Varianza
	1551,35	520,69	0,34	33,56	271115,41

Se ha obtenido una media de resultados muy elevada (1551,35 mg ácido galacturónico/g pectina Sigma y 953,94 mg ácido galacturónico/g pectina Special Ingredients) con respecto a las otras metodologías, además de que los coeficientes de variación son bastante elevados (33,56% Sigma y 28,61% Special Ingredients). Existe una enorme disparidad en el resultado final entre los dos tipos de pectinas comerciales, obteniendo los mejores resultados de precisión en la muestra de pectina Special Ingredients ( $S=\pm 272,96$ ;  $CV= 28,61\%$  y  $S^2=74504,69$ ). No es posible que se obtengan resultados donde la cantidad de miligramos de ácido galacturónico supere a la cantidad de pectina o sea su mayoría absoluta, ya que un 65% de la estructura de la pectina está compuesta por HG y el porcentaje restante de RG-I y RG-II, que contienen otros azúcares neutros [4] por lo que se puede considerar que ha habido una interferencia de los otros monosacáridos durante las reacciones. Entonces se considera que estos resultados no son representativos de las cantidades de ácido galacturónico real presente en las pectinas comerciales.

#### 4.1.4. Precisión de los resultados del método de Melton-Smith.

En la *tabla 12* aparecen los resultados de los parámetros de precisión de la recta de calibración del método de Melton-Smith. Se puede observar que el promedio del CV y la varianza presentan valores ligeramente elevados, por lo que se puede asegurar que este método presenta una precisión moderada.

**Tabla 12 Parámetros de precisión del método de Melton-Smith**

Concentración (ppm)	Promedio Absorbancia (n=5)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
10	0,076	0,02	0,25	25,26	3,69E-04
20	0,170	0,03	0,16	16,48	7,89E-04
30	0,238	0,03	0,12	11,65	7,66E-04
40	0,296	0,07	0,23	23,48	4,82E-03
60	0,495	0,13	0,26	25,76	1,63E-02
80	0,734	0,16	0,22	22,13	2,64E-02
	Promedio prametros	0,06	0,18	17,82	7,06E-03

Los resultados del método de Melton-Smith para las muestras de pectinas comerciales preparadas con diferentes concentraciones se presentan en las *tablas 13 y 14*, expresados como miligramos de ácido galacturónico por cada gramo de pectina. Estos resultados se han obtenido al analizar diferentes muestras de pectinas comerciales por duplicado en los dos diferentes espectrofotómetros mencionados en el *apartado 3.1. "Materiales y equipo"*, el de doble haz y de un solo haz, y por cada instrumento también se mide por duplicado. Se realizan las medias, se calculan los parámetros de precisión y se obtiene un resultado final, expresado en mg de ácido galacturónico/g de pectina.

**Tabla 13 Resultados del método de Melton-Smith de la pectina comercial Special Ingredients**

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina monohaz ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina monohaz ensayo 2	
Muestra 1	194,54	205,46	128,39	304,65
Muestra 2	144,26	167,21	126,59	209,64
Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina Doble haz ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina Doble haz ensayo 2	
Muestra 1	112,48	117,30	249,45	-
Muestra 2	230,04	146,39	195,36	-

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	Media mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
Muestra 1	187,47	73,01	0,39	38,95	5330,89
Muestra 2	168,31	38,32	0,23	22,77	1468,54

Resultado final ácido galacturónico Special Ingredients	Media total mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	177,89	13,55	0,08	7,62	183,54

**Tabla 14 Resultados del método de Melton Smith de la pectina comercial Sigma**

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina monohaz ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina monohaz ensayo 2	
Muestra 1	238,25	168,85	459,54	533,42
Muestra 2	240,44	280,87	256,86	260,58
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina Doble haz ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina Doble haz ensayo 2	
Muestra 1	312,00	349,92	315,03	-
Muestra 2	144,77	215,23	413,39	-

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	Media mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
Muestra 1	339,57	124,40	0,37	36,63	15474,82
Muestra 2	258,88	81,27	0,31	31,39	6604,96

Resultado final ácido galacturónico Sigma	Media total mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	299,22	57,06	0,19	19,07	3255,81

Se ha obtenido una media de resultados más correcta con respecto a las otras metodologías. Existe una diferencia destacable en el resultado final entre los dos tipos de pectinas comerciales. La muestra de pectina comercial Special Ingredients tiene un menor resultado final pero la desviación estándar y el coeficiente de variación son bastante aceptables (177,89 mg ácido galacturónico/g pectina;  $S = \pm 13,55$  y  $CV = 7,62\%$ ). Por otro lado, la muestra de pectina comercial Sigma casi duplica el resultado final con respecto a la muestra Special Ingredients, sin embargo, la desviación estándar y el coeficiente mayor son superiores, denotando una menor precisión en las medidas (299,22 mg ácido galacturónico/g pectina;  $S = \pm 57,06$  y  $CV = 19,07\%$ ). Se considera

que estos resultados son representativos de las cantidades de ácido galacturónico real presente en las pectinas comerciales.

Los resultados de las muestras de pectina extraída de pulpa de remolacha se presentan en la *tabla 15*, expresados como miligramos de ácido galacturónico por cada gramo de pectina. Estos resultados provienen de medir dos muestras de pectina de remolacha (muestra A y muestra B) por duplicado mediante el ensayo de Melton-Smith, que ha demostrado ser el método más preciso y válido para cuantificar ácido galacturónico en pectina. Este método se realizó para estas muestras dos veces. Los resultados se analizan en el espectrofotómetro de un solo haz. Se realizan las medias, se calculan los parámetros de precisión y se obtiene un resultado final, expresado en mg de ácido galacturónico/g de pectina.

**Tabla 15 Resultados del método de Melton Smith de la pectina extraída de la pulpa de remolacha**

Concentración Pectina Pulpa Remolacha muestra A (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 2	
Sub-muestra 1	23,48	15,91	17,50	11,86
Sub-muestra 2	10,79	-	15,42	15,25
Concentración Pectina Pulpa Remolacha muestra B (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 2	
Sub-muestra 1	18,88	8,72	14,81	9,93
Sub-muestra 2	15,57	-	12,50	16,27

Concentración Pectina Pulpa Remolacha (mg/L)	Media mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
Muestra A	15,75	4,14	0,26	26,32	17,17
Muestra B	13,81	3,62	0,26	26,20	13,09

Resultado final ácido galacturónico pectina remolacha	Media total mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	14,78	1,37	0,09	9,26	1,87

El resultado final de la cantidad de ácido galacturónico por gramo de pectina de la muestra de remolacha es considerablemente menor con respecto a los valores obtenidos de las pectinas comerciales (14,78 mg ácido galacturónico/g pectina). La causa de dicho resultado puede ser debido a que el proceso de extracción de la pectina a partir de las muestras de remolacha no se realizó correctamente, con posibles contaminaciones de la pectina provocando que dichas impurezas interfirieran durante la medición de la absorbancia o durante las reacciones que se realizan en el método analítico. Otra de las posibles razones radica en la hidrólisis de la pectina, que no se hubiera realizado correctamente y hubiera que cambiar las condiciones de hidrólisis, por ejemplo, cambios en el tiempo, temperatura y concentración del ácido. A pesar de ello, los resultados de precisión del análisis son aceptables ( $S = \pm 1,37$  y  $CV = 9,26\%$ )

#### 4.1.5. Precisión de los resultados del método de Anthon-Barret.

En la *tabla 16* aparecen los resultados de los parámetros de precisión de la recta de calibración del método de Anthon-Barret. Se puede observar que el promedio del CV y la varianza presentan valores bastante elevados, por lo que se puede asegurar que este método presenta poca precisión.

**Tabla 16 Parámetros de precisión del método de Anthon-Barret**

Concentración (ppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
1	0,136	0,16	1,16	115,76	2,49E-02
10	0,180	0,11	0,64	63,60	1,31E-02
20	0,213	0,14	0,67	67,50	2,06E-02
30	0,369	0,10	0,28	27,54	1,03E-02
40	0,524	0,09	0,18	17,65	8,53E-03
60	0,661	0,14	0,21	21,20	1,96E-02
80	0,791	0,20	0,26	25,52	4,07E-02
	Promedio prametros	0,12	0,42	42,35	1,72E-02

Los resultados del método de Anthon-Barret para las muestras de pectinas comerciales preparadas con diferentes concentraciones se presentan en las *tablas 17 y 18*, expresados como miligramos de ácido galacturónico por cada gramo de pectina. Estos resultados se han obtenido al analizar diferentes muestras de pectinas comerciales preparadas a varias concentraciones (25-100-150 ppm) por duplicado en el espectrofotómetro de un solo haz, además de que se realizaron 4 ensayos diferentes. Se realizan las medias, se calculan los parámetros de precisión y se obtiene un resultado final, expresado en mg de ácido galacturónico/g de pectina.

**Tabla 17 Resultados del método de Anthon-Barret utilizando de la pectina comercial Special Ingredients**

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 2	
25	-122,22	-22,22	-74,58	-176,27
100	-72,22	-22,22	10,17	-3,39
150	11,11	-44,44	-9,04	-27,12
Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 3		mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 4	
25	-12,31	184,62	-0,80	-0,68
100	-3,08	40,00	0,01	-0,19
150	19,49	11,28	6,54	13,21

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	Media mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
25	-28,06	106,91	-3,81	-381,02	11428,95
100	-6,37	31,87	-5,01	-500,70	1015,74
150	-2,37	22,66	-9,55	-955,43	513,59

Resultado final ácido galacturónico Special Ingredients	Media total mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	-17,21	15,34	-0,89	-89,12	191,05

**Tabla 18 Resultados del método de Anthon-Barret utilizando de la pectina comercial Sigma**

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 1		mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 2	
25	-200,00	-233,33	-122,03	-142,37
100	-47,22	72,22	-28,81	44,07
150	-9,26	162,96	-5,65	99,44
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 3		mg ácido galacturónico /g pectina ensayo 4	
25	6,15	-18,46	-0,80	-0,68
100	15,38	12,31	0,01	-0,19
150	10,26	13,33	6,54	13,21

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	Media mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
25	-88,94	97,62	-1,10	-109,75	9528,94
100	8,47	37,86	4,47	446,92	1433,19
150	36,35	61,52	1,69	169,22	3784,23

Resultado final ácido galacturónico Sigma	Media total mg ácido galacturónico/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	-14,71	65,78	-4,47	-447,34	4327,52

Se ha obtenido resultados finales con valores negativos (-14,17 mg ácido galacturónico/g pectina Sigma y -17,21 mg ácido galacturónico/g pectina Special Ingredients), lo cual en este tipo de análisis carece de sentido. La razón de ello es debido a que algunas medidas de las diferentes muestras de pectinas comerciales poseían una absorbancia menor que los valores de la muestra en blanco (Absorbancia blanco antes de realizar el 0 de absorbancia = 0.119), por lo que debe de haber alguna interferencia con otros compuestos que contiene la pectina que reaccionan durante el ensayo de Anthon-Barret permitiendo enmascarar la absorbancia del ácido galacturónico. También la mayoría de parámetros de precisión han obtenido valores negativos (RSD = -4,47 y CV= -447,34 en la pectina Sigma y RSD = -0,89 y CV= -89,12 pectina Special Ingredients). Finalmente, se considera que estos resultados tampoco no son representativos de las cantidades de ácido galacturónico real presente en las pectinas comerciales.

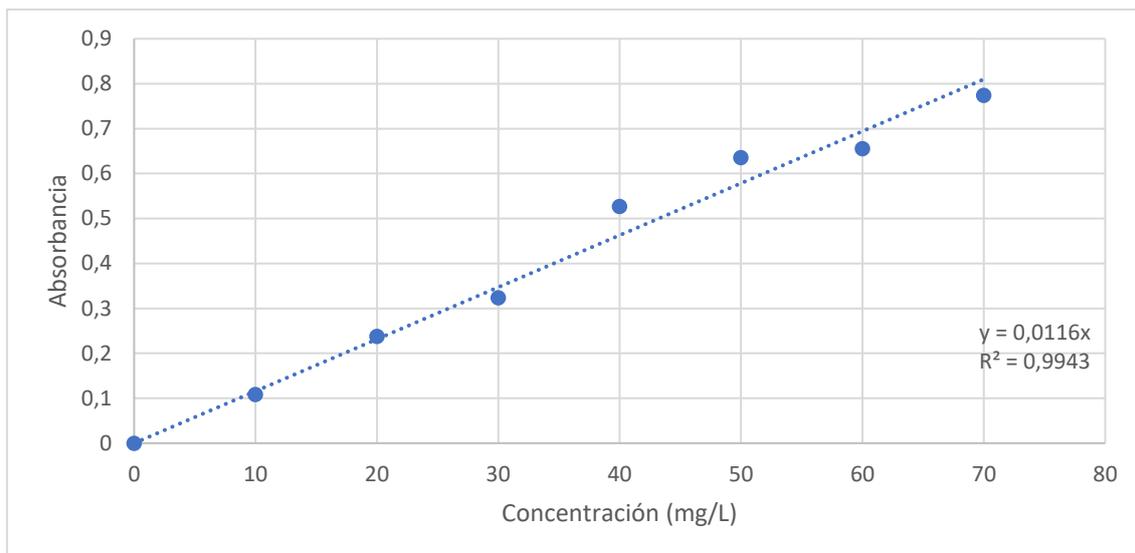
#### 4.1.6. Determinación de ácido galacturónico. Resumen de los resultados

A la vista de los resultados obtenidos el método de Melton-Smith es aquel que podemos seleccionar como el método más adecuado para medir el contenido de ácido galacturónico en muestras de pectinas. A pesar de la aceptable linealidad y linealidad de respuesta que presenta el método de Anthon-Barret, los parámetros de precisión y los resultados de las muestras comerciales de pectina no pueden validar esta metodología, puesto que estos datos no son representativos de un análisis químico. Además, el método de Filisetti-Cozzi y Carpita, el cual podemos considerar como un predecesor del método de Melton-Smith, tampoco es viable para realizar un análisis del contenido de ácido D-Galacturónico porque sus parámetros de precisión, linealidad y linealidad de respuesta no se pueden aceptar.

## 4.2. Determinación de azúcares totales. Validación del método espectrofotométrico.

### 4.2.1. Linealidad de respuesta del método del reactivo fenol-sulfúrico.

En la *Figura 12* se muestra la línea de calibración obtenida para el método del reactivo fenol-sulfúrico para la determinación de azúcares totales realizada con patrones de glucosa disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 70 mg/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



**Figura 12 Recta de calibración del método del reactivo fenol-sulfúrico (n=2)**

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 0,9943$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es aceptable.

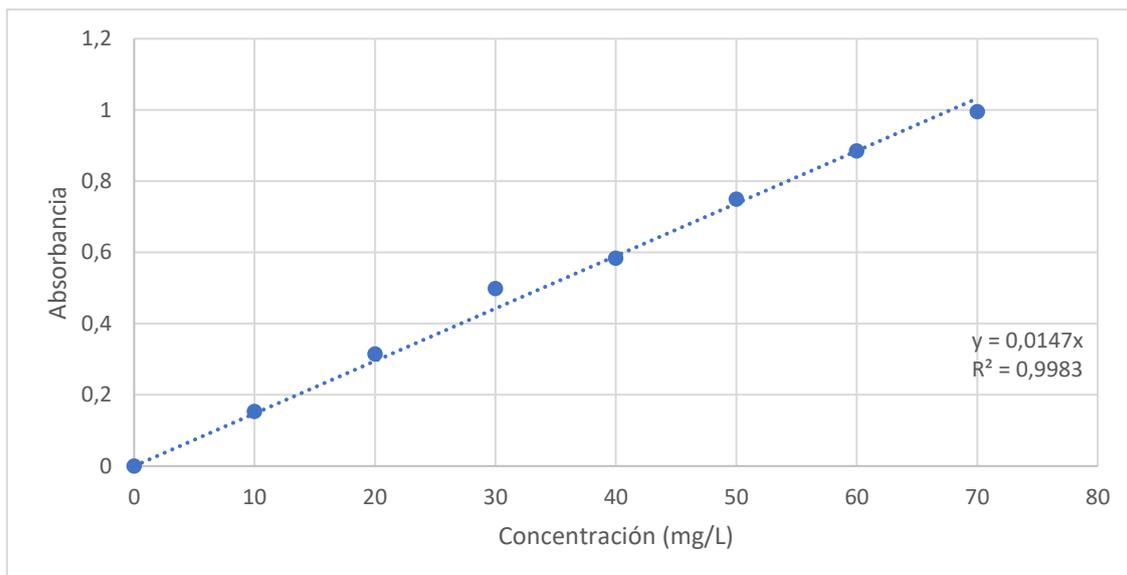
En la *Tabla 19* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crit}}=3,58$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=1,14$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

**Tabla 19 Análisis de varianza de la recta de calibración del método del reactivo fenol-sulfúrico**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	1,09E+00	1	1,09E+00	331,02	0,0000
Residuo	4,60E-02	14	3,28E-03		
Carencia de Ajuste	2,12E-02	6	3,53E-03	1,14	0,421
Error Puro	2,48E-02	8	3,10E-03		
Total (Corr.)	1,13E+00	15			

#### 4.2.2. Linealidad de respuesta del método del reactivo antrona.

En la *Figura 13* se muestra la línea de calibración obtenida para el método del reactivo antrona para la determinación de azúcares totales realizada con patrones de glucosa disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 70 mg/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



**Figura 13 Recta de calibración del método del reactivo antrona (n=2)**

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 0,9983$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es aceptable.

En la *Tabla 20* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crit}}=3,58$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=1,95$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

**Tabla 20 Análisis de varianza de la recta de calibración del método del reactivo antrona**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,76E+00	1	1,76E+00	3599,42	0,0000
Residuo	6,86E-03	14	4,90E-04		
Carencia de Ajuste	4,07E-03	6	6,79E-04	1,95	0,1886
Error Puro	2,79E-03	8	3,50E-04		
Total (Corr.)	1,77E+00	15			

#### 4.2.3. Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método espectrofotométrico. Azúcares Totales.

Al igual que en el apartado 4.1.2 “Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método espectrofotométrico. Ácido galacturónico”, se hacen uso de las ecuaciones 2 y 3 para determinar el LOD y LOQ. El LOL se determina cuando la recta de calibración pierde la linealidad, la cual coincide con el último punto de calibración. En la *Tabla 21* figuran los resultados de los diferentes métodos para determinar azúcar total.

**Tabla 21 LOD, LOQ y LOL (concentración en mg/L) de los métodos de la determinación de azúcares totales**

Método	LOD	LOQ	LOL
Fenol-Sulfúrico	4,85	16,18	83,30
Antrona	3,34	11,13	67,59

#### 4.2.4. Precisión de los resultados del método del reactivo del fenol-sulfúrico.

En la *tabla 22* aparecen los resultados de los parámetros de precisión de la recta de calibración del método del reactivo del fenol-sulfúrico. Se puede observar que el promedio del CV y la varianza no presentan valores muy elevados, por lo que se podría confirmar que es un método preciso.

**Tabla 22 Parámetros de precisión del método del reactivo del fenol sulfúrico**

Concentración (ppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
10	0,109	0,03	0,27	26,98	8,61E-04
20	0,238	0,02	0,08	7,88	3,51E-04
30	0,324	0,04	0,11	10,93	1,25E-03
40	0,527	0,02	0,04	4,43	5,45E-04
50	0,636	0,05	0,07	7,17	2,08E-03
60	0,656	0,11	0,16	16,18	1,13E-02
70	0,775	0,09	0,12	12,05	8,71E-03
Promedio prametros		0,04	0,11	10,70	3,13E-03

Los resultados del método del reactivo fenol-sulfúrico para las muestras de pectinas comerciales preparadas con diferentes concentraciones se presentan en las *tablas 23 y 24*, expresados como miligramos de azúcar total por cada gramo de pectina. Estos resultados se han obtenido al analizar diferentes muestras de pectinas comerciales preparadas a varias concentraciones (20-50-80 ppm) por duplicado en los dos diferentes espectrofotómetros mencionados en el *apartado 3.1. "Materiales y equipo"*, el de doble haz y de un solo haz, y por cada instrumento también se mide por duplicado. Se realizan las medias, se calculan los parámetros de precisión y se obtiene un resultado final, expresado en mg de azúcares totales/g de pectina.

**Tabla 23 Resultados método del reactivo fenol-sulfúrico utilizando los espectrofotómetros de doble y mono haz de la pectina comercial Special Ingredients**

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 1		mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 2	
	20	61,22	430,05	405,59
50	416,33	346,86	405,59	
80	529,34	392,49	488,64	
Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 1		mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 2	
	20	416,67	388,89	550,46
50	387,50	397,22	511,93	524,77
80	382,81	398,44	505,73	526,38

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	Media mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
20	395,23	158,92	0,40	40,21	25254,16
50	427,17	66,10	0,15	15,47	4368,82
80	460,55	66,37	0,14	14,41	4404,79

Resultado final Azúcar Total Special Ingredients	Media total mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	427,65	32,66	0,08	7,64	1066,55

**Tabla 24 Resultados método del reactivo fenol-sulfúrico utilizando los espectrofotómetros de doble y mono haz de la pectina comercial Sigma**

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 1		mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 2	
20	-234,70		367,13	381,12
50	208,16		334,27	328,67
80	331,64		327,80	317,31
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 1		mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 2	
20	315,97	520,83	417,43	688,07
50	311,11	380,56	411,01	502,75
80	306,42	343,75	404,82	454,13

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	Media mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
20	350,84	286,45	0,82	81,65	82052,27
50	353,79	91,49	0,26	25,86	8370,32
80	355,12	54,01	0,15	15,21	2916,79

Resultado final Azúcar Total Sigma	Media total mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	353,25	2,19	0,01	0,62	4,81

Los resultados finales para las dos muestras de pectina comercial no difieren mucho entre ellas (352,25 mg azúcar total/g pectina Sigma y 427,65 mg azúcar total/g pectina Special Ingredients), y los parámetros de precisión para ambas muestras son bastante buenas ( $S = \pm 2,19$  y  $CV = 0,62\%$  en muestra Sigma y  $S = \pm 32,66$  y  $CV = 7,64\%$  en muestra Special Ingredients), obteniendo las mejores respuestas de precisión en las muestras de pectina Sigma. Se confirma que este método es totalmente valido para caracterizar azúcares totales en muestras de pectina.

#### 4.2.5. Precisión de los resultados del método del reactivo antrona.

En la *tabla 25* aparecen los resultados de los parámetros de precisión de la recta de calibración del método del reactivo del fenol-sulfúrico. Se puede observar que el promedio del CV y la desviación estándar no presentan valores muy elevados, por lo que se podría confirmar que es un método preciso.

**Tabla 25 Parámetros de precisión del método del reactivo del antrona**

Concentración (ppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
10	0,154	0,01	0,04	4,25	4,27E-05
20	0,313	0,04	0,13	13,36	1,75E-03
30	0,501	0,05	0,11	10,76	2,90E-03
40	0,582	0,01	0,02	1,70	9,79E-05
50	0,750	0,01	0,02	1,67	1,57E-04
60	0,888	0,03	0,03	3,03	7,25E-04
70	0,992	0,01	0,01	1,11	1,22E-04
Promedio prametros		0,02	0,04	4,49	7,25E-04

Los resultados del método del reactivo antrona para las muestras de pectinas comerciales preparadas con diferentes concentraciones se presentan en las *tablas 26 y 27*, expresados como miligramos de azúcar total por cada gramo de pectina. Estos resultados se han obtenido al analizar diferentes muestras de pectinas comerciales preparadas a varias concentraciones (20-50-80 ppm) por duplicado en los dos diferentes espectrofotómetros mencionados en el *apartado 3.1. "Materiales y equipo"*, el de doble haz y de un solo haz, y por cada instrumento también se mide por duplicado. Se realizan las medias, se calculan los parámetros de precisión y se obtiene un resultado final, expresado en mg de azúcares totales/g de pectina.

**Tabla 26 Resultados método del reactivo antrona utilizando los espectrofotómetros de doble y mono haz de la pectina comercial Special Ingredients**

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 1	mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 2	
20	248,32	493,06	791,67
50	53,69	169,44	90,28
80	183,72	185,76	177,95
Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 1	mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 2	
20	288,08	155,41	300,68
50	26,49	154,05	68,92
80	193,71	171,45	163,85

Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)	Media mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coficiente de Variación %	Varianza
20	379,53	230,12	0,61	60,63	52954,64
50	93,81	56,79	0,61	60,53	3224,69
80	179,41	10,69	0,06	5,96	114,19

Resultado final Azúcar Total Special Ingredients	Media total mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coficiente de Variación %	Varianza
	217,59	146,64	0,67	67,39	21502,26

**Tabla 27 Resultados método del reactivo antrona utilizando los espectrofotómetros de doble y mono haz de la pectina comercial Sigma**

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 1	mg Azúcar Total /g pectina mono haz ensayo 2	
20	637,58	666,67	475,69
50	390,60	365,28	416,67
80	431,21	401,04	421,88
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 1	mg Azúcar Total /g pectina doble haz ensayo 2	
20	407,28	489,86	429,05
50	406,62	359,46	404,05
80	394,04	396,11	413,85

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	Media mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coficiente de Variación %	Varianza
20	517,69	108,77	0,21	21,01	11830,42
50	390,45	23,36	0,06	5,98	545,60
80	409,69	15,05	0,04	3,67	226,57

Resultado final Azúcar Total Sigma	Media total mg Azúcar Total/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coficiente de Variación %	Varianza
	439,28	68,59	0,16	15,61	4704,32

Los resultados finales de azúcar total por este método también son aceptables (439,28 mg azúcar total/g pectina Sigma y 217,59 mg ácido galacturónico/g pectina Special Ingredients), sin embargo, los parámetros de precisión son más elevados con respecto al método del reactivo fenol-sulfúrico ( $S = \pm 68,59$  y  $CV = 15,91\%$  en muestra Sigma y  $S = \pm 149,64$  y  $CV = 67,39\%$  en muestra Special Ingredients), en especial en el análisis de la muestra de pectina Special Ingredients. Los resultados finales de las muestras comerciales presentan diferencias significativas entre ellas.

#### 4.2.6. Determinación de azúcares totales. Resumen de los resultados.

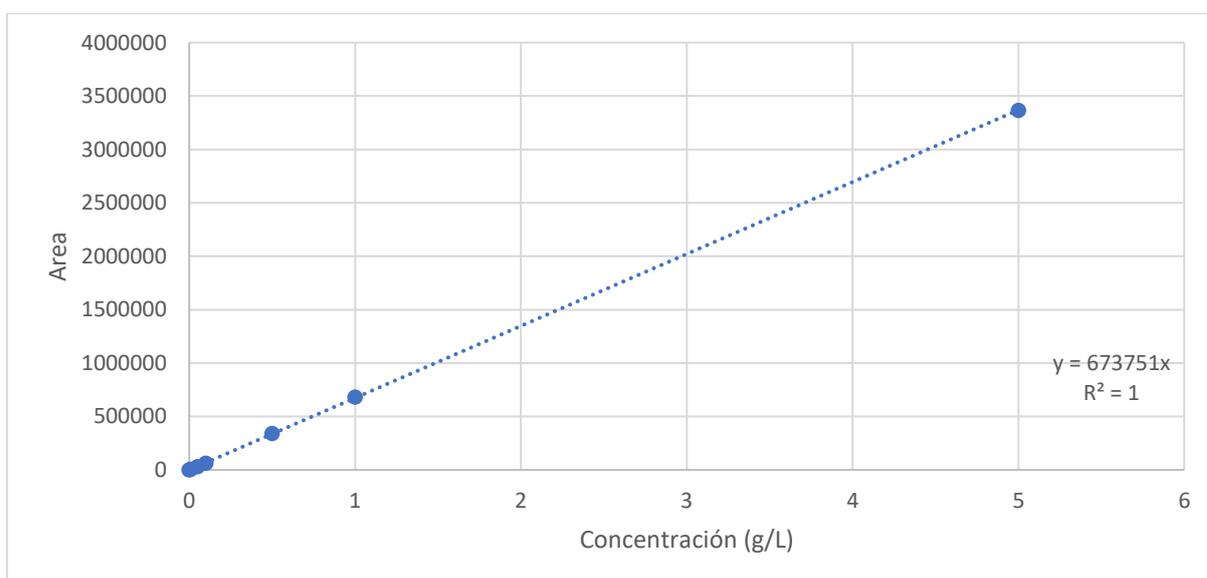
A la vista de los resultados obtenidos el método del reactivo fenol-sulfúrico es aquel que podemos considerar como un método válido a la hora de poder medir el contenido de ácido galacturónico en muestras de pectinas, además de, en comparación con el reactivo antrona, es menos tóxico, más barato y perjudicial contra el medio ambiente. Además, las disoluciones en  $H_2SO_4$  no son estables y el uso de la antrona está limitado para azúcares metilados y pentosas [32], por lo que no es capaz de analizar la totalidad de azúcares totales. A pesar de que ambos métodos presentan linealidad y linealidad de respuesta aceptables, el método que presenta los peores resultados los parámetros de precisión es el método del reactivo antrona.

#### 4.3. Determinación de azúcares neutros. Validación del método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Para cada una de las diferentes metodologías de hidrólisis para la obtención de azúcares neutros se elabora una recta de calibración por azúcar. El promedio de estas rectas de calibración es usado para obtener las concentraciones de los monosacáridos, los parámetros de precisión y la linealidad de respuesta.

##### 4.3.1. Linealidad de la respuesta de D-Glucosa

En la *Figura 14* se muestra la línea de calibración obtenida para la determinación de monosacáridos neutros usando HPLC realizada con patrones de D-Glucosa disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 5 g/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



**Figura 14** Recta de calibración del HPLC para D-Glucosa (n=2)

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 1$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es perfecta.

En la *Tabla 28* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crítico}}=3,97$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,00$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crítico}}$ , se acepta

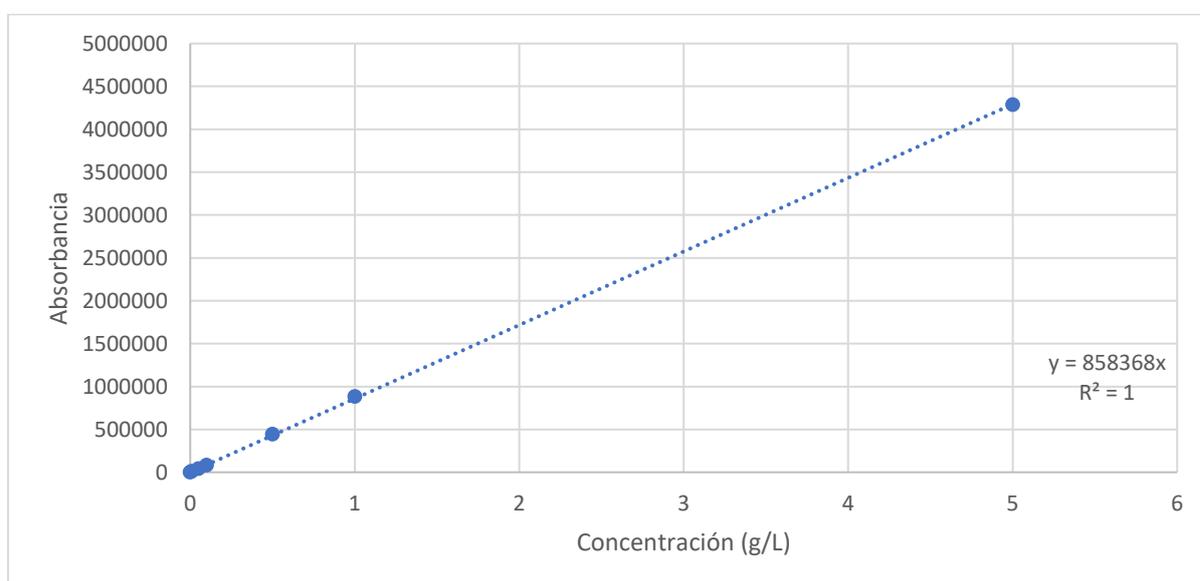
la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

**Tabla 28** Análisis de varianza de la recta de calibración del HPLC del monosacárido D-Glucosa

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,81E+13	1	1,81E+13	148,84	0,0000
Residuo	1,46E+12	12	1,22E+11		
Carencia de Ajuste	1,95E+08	5	3,90E+07	0,00	1,0000
Error Puro	1,46E+12	7	2,08E+11		
Total (Corr.)	1,95E+13	13			

#### 4.3.2. Linealidad de la respuesta de D-Galactosa

En la *Figura 15* se muestra la línea de calibración obtenida para la determinación de monosacáridos neutros usando HPLC realizada con patrones de D-Galactosa disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 5 g/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



**Figura 15** Recta de calibración del HPLC para D-Galactosa (n=2)

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 1$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es perfecta.

En la *Tabla 29* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crit}}=3,97$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,12$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

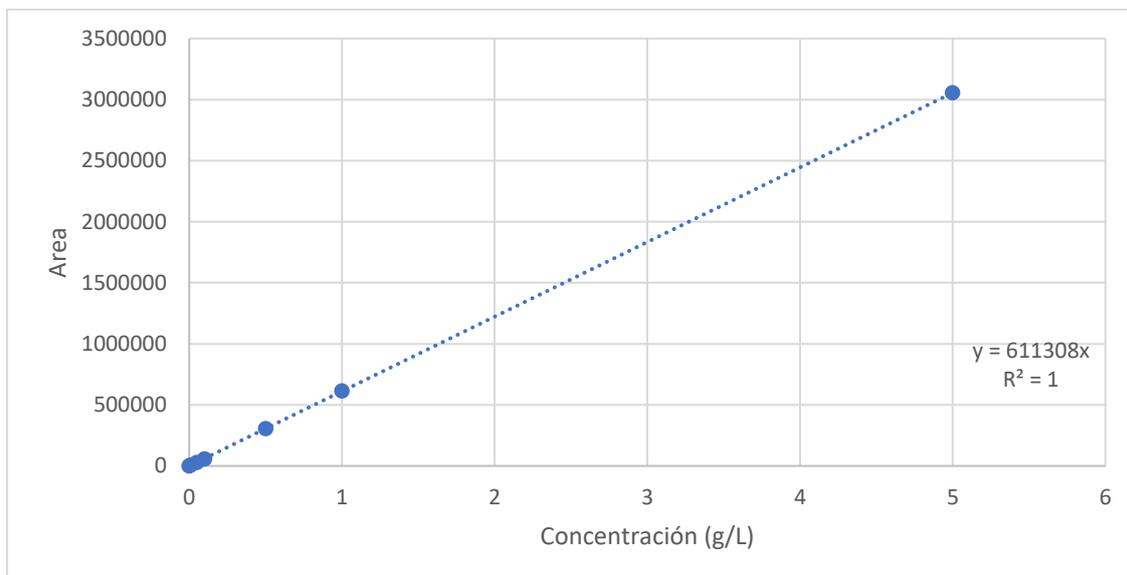
**Tabla 29** Análisis de varianza de la recta de calibración del HPLC del monosacárido D-Galactosa

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,93E+13	1	2,93E+13	17093,75	0,0000
Residuo	2,06E+10	12	1,71E+09		
Carencia de Ajuste	1,57E+09	5	3,14E+08	0,12	0,9848
Error Puro	1,90E+10	7	2,71E+09		

Total (Corr.)	2,93E+13	13			
---------------	----------	----	--	--	--

#### 4.3.3. Linealidad de la respuesta de ácido D-Galacturónico

En la *Figura 16* se muestra la línea de calibración obtenida para la determinación de monosacáridos neutros usando HPLC realizada con patrones de ácido D-Galacturónico disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 5 g/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



**Figura 16 Recta de calibración del HPLC para ácido D-Galacturónico (n=2)**

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 1$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es perfecta.

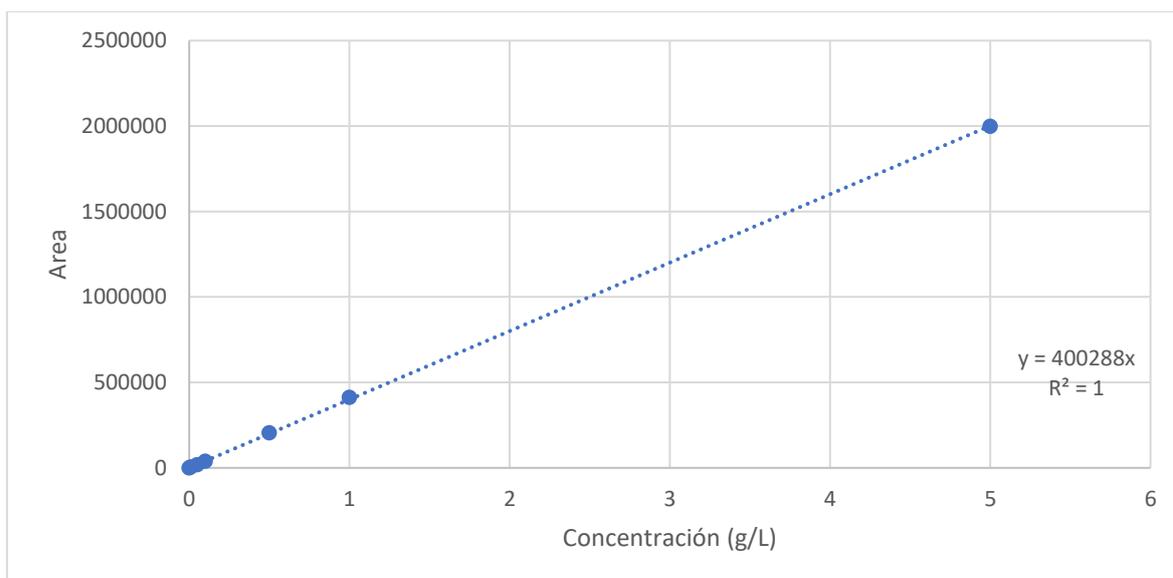
En la *Tabla 30* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crítico}}=3,97$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,00$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crítico}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

**Tabla 30 Análisis de varianza de la recta de calibración del HPLC del monosacárido ácido D-Galacturónico**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,49E+13	1	1,49E+13	195,24	0,0000
Residuo	9,16E+11	12	7,63E+10		
Carencia de Ajuste	6,60E+07	5	1,32E+07	0,00	1,0000
Error Puro	9,16E+11	7	1,31E+11		
Total (Corr.)	1,58E+13	13			

#### 4.3.4. Linealidad de la respuesta de L-Arabinosa

En la *Figura 17* se muestra la línea de calibración obtenida para la determinación de monosacáridos neutros usando HPLC realizada con patrones de L-arabinosa disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 5 g/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



**Figura 17 Recta de calibración del HPLC para L-arabinosa (n=2)**

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 1$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es perfecta.

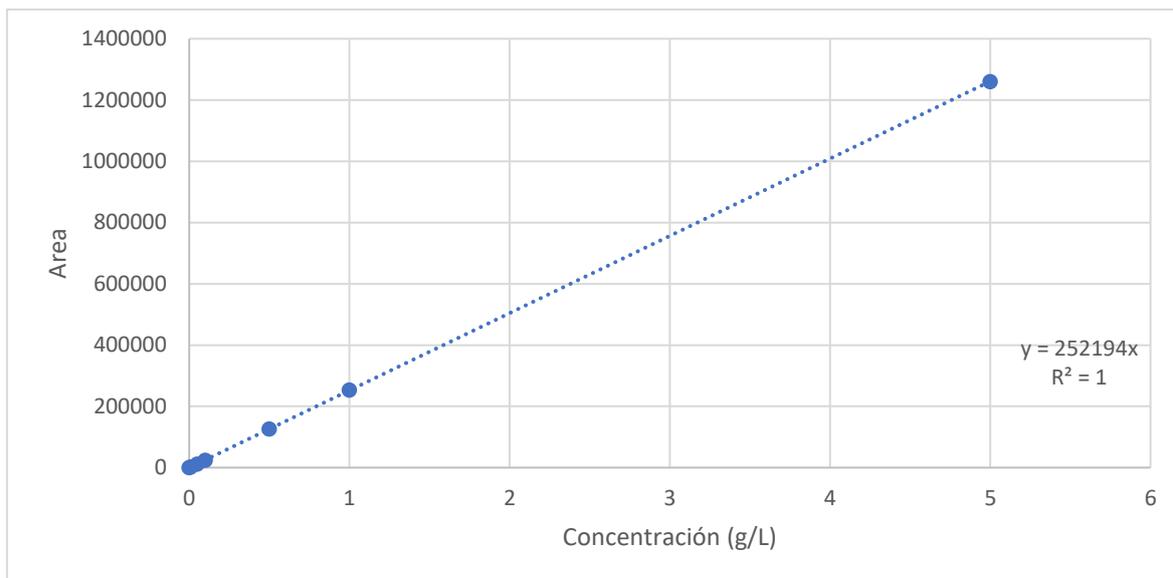
En la *Tabla 31* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crit}}=3,97$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,00$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianza y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

**Tabla 31 Análisis de varianza de la recta de calibración del HPLC del monosacárido L-arabinosa**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	6,37E+12	1	6,37E+12	98,78	0,0000
Residuo	7,74E+11	12	6,45E+10		
Carencia de Ajuste	2,80E+08	5	5,60E+07	0,00	1,0000
Error Puro	7,73E+11	7	1,11E+11		
Total (Corr.)	7,14E+12	13			

#### 4.3.5. Linealidad de la respuesta de L-Ramnosa

En la *Figura 18* se muestra la línea de calibración obtenida para la determinación de monosacáridos neutros usando HPLC realizada con patrones de L-ramnosa disueltos en agua en un intervalo de concentraciones de 0 a 5 g/L. Para mayores concentraciones la respuesta no era lineal.



**Figura 18 Recta de calibración del HPLC para L-ramnosa (n=2)**

Como se puede observar el coeficiente de correlación obtenido es de  $R^2 = 1$ . En los protocolos de métodos de validación el valor de correlación es  $R \geq 0,99$ , por lo que la linealidad del método es perfecta.

En la *Tabla 32* se recogen los resultados obtenidos por el ANOVA. Se comprueba si hay falta de ajuste de la recta de calibración mediante el test de hipótesis. El valor de  $F_{\text{crítico}}$  para un nivel de confianza de 95% es  $F_{\text{crit}}=3,97$ . Dado que el valor de  $F_{\text{experimental}}$  es  $F_{\text{exp}}=0,00$ , y  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta la hipótesis nula: hay homogeneidad de varianzas y presenta linealidad. Se confirma la validación del modelo lineal y la carencia de falta de ajuste.

**Tabla 32 Análisis de varianza de la recta de calibración del HPLC del monosacárido L-ramnosa**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,53E+12	1	2,53E+12	19,66	0,0008
Residuo	1,55E+12	12	1,29E+11		
Carencia de Ajuste	7,11E+06	5	1,42E+06	0,00	1,0000
Error Puro	1,55E+12	7	2,21E+11		
Total (Corr.)	4,08E+12	13			

#### 4.3.6. Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método de cromatografía líquida a alta presión (HPLC). Azúcares Neutros.

Al igual que en el apartado 4.1.2 "Límite de Detección (LOD), Límite de Cuantificación (LOQ) y Límite de Linealidad (LOL) del método espectrofotométrico. Ácido galacturónico", se hacen uso de las ecuaciones 2 y 3 para determinar el LOD y LOQ. El LOL se determina cuando la recta de calibración pierde la linealidad, la cual coincide con el último punto de calibración. En la *Tabla 33* figuran los resultados de los diferentes patrones de azúcares neutros.

**Tabla 33 LOD, LOQ y LOL (concentración en mg/L) de los métodos de la determinación de azúcares neutros mediante HPLC**

Monosacárido	LOD	LOQ	LOL
D-Glucosa	20	66	5000
D-Galactosa	44	146	5000

Ácido D-Galacturónico	10	35	5000
L-Arabinosa	40	132	5000
L-Ramnosa	10	33	5000

#### 4.3.7. Precisión de los resultados de la cromatografía líquida de alta presión. Azúcares neutros

En las *tablas 34,35,36,37 y 38* aparecen los resultados de los parámetros de precisión de la recta de calibración del método por HPLC para cada uno de los diferentes azúcares neutros. Un vistazo general de los resultados de los CV nos dice que la calibración tiene poca precisión, puesto que la mayoría de CV presentes tienen un valor cercano al 30%, por lo que la media es poco representativa.

**Tabla 34 Parámetros de precisión de D-Glucosa por el método por HPLC**

Concentración (mg/L)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00E+00
10	7277,02	1592,43	0,22	21,88	2,54E+06
50	31319,60	15125,86	0,48	48,30	2,29E+08
100	63723,70	28718,01	0,45	45,07	8,25E+08
500	341755,50	110869,39	0,32	32,44	1,23E+10
1000	681198,50	225009,16	0,33	33,03	5,06E+10
5000	3366871,50	1180371,23	0,35	35,06	1,39E+12
	<b>Promedio prametros</b>	223098,01	0,31	30,83	2,08E+11

Se puede observar que el promedio del CV presenta un valor elevado, al igual que su varianza, por lo que se podría confirmar que la precisión de los patrones de D-Glucosa es baja.

**Tabla 35 Parámetros de precisión de D-Galactosa por el método por HPLC**

Concentración (pppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
10	9755,52	1912,70	0,20	19,61	3,66E+06
50	39714,60	3253,54	0,08	8,19	1,06E+07
100	80903,70	4421,82	0,05	5,47	1,96E+07
500	445255,00	35501,00	0,08	7,97	1,26E+09
1000	882603,50	59820,53	0,07	6,78	3,58E+09
5000	4285514,50	118786,16	0,03	2,77	1,41E+10
	<b>Promedio prametros</b>	31956,54	0,07	7,26	2,71E+09

Se puede observar que el promedio del CV presenta un valor bajo y el valor de la varianza es más bajo que en el resto de monosacáridos analizados, por lo que se podría confirmar la precisión de los patrones de D-Galactosa es adecuada.

**Tabla 36 Parámetros de precisión del ácido D-Galacturónico por el método por HPLC**

Concentración (pppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
10	6491,26	1332,55	0,21	20,53	1,78E+06
50	28043,78	12902,97	0,46	46,01	1,66E+08
100	57138,55	24319,59	0,43	42,56	5,91E+08
500	304834,25	94527,80	0,31	31,01	8,94E+09
1000	614845,50	181734,22	0,30	29,56	3,30E+10
5000	3056020,00	934420,40	0,31	30,58	8,73E+11
	<b>Promedio prametros</b>	178462,50	0,29	28,61	1,31E+11

Se puede observar que el promedio del CV y la varianza presentan valores elevados, por lo que se podría confirmar que la precisión para los patrones de ácido D-Galacturónico es baja.

**Tabla 37 Parámetros de precisión de L-Arabinosa por el método por HPLC**

Concentración (pppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
10	4487,46	1030,19	0,23	22,96	1,06E+06
50	19014,78	9991,10	0,53	52,54	9,98E+07
100	38858,05	18810,53	0,48	48,41	3,54E+08
500	205576,75	78091,11	0,38	37,99	6,10E+09
1000	411626,50	155513,29	0,38	37,78	2,42E+10
5000	1998663,50	861668,30	0,43	43,11	7,42E+11
	Promedio prametros	160729,22	0,35	34,68	1,10E+11

Se puede observar que el promedio del CV y la varianza presentan valores elevados, por lo que se podría confirmar que es la precisión para los patrones de L-Arabinosa es baja.

**Tabla 38 Parámetros de precisión de L-Ramnosa por el método por HPLC**

Concentración (pppm)	Promedio Absorbancia (n=2)	Desviación Estándar (S)	Desviación Estándar Relativa (RSD)	Coefficiente de Variación (%) (CV)	Varianza (S <sup>2</sup> )
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
10	2568,38	2360,86	0,92	91,92	5,57E+06
50	12237,40	12659,19	1,03	103,45	1,60E+08
100	24633,80	25093,52	1,02	101,87	6,30E+08
500	127012,50	120032,08	0,95	94,50	1,44E+10
1000	253723,00	240491,26	0,95	94,78	5,78E+10
5000	1260588,00	1213808,19	0,96	96,29	1,47E+12
	Promedio prametros	230635,01	0,83	83,26	2,21E+11

Se puede observar que el promedio del CV y la varianza son especialmente elevados, sobre todo el coeficiente de variación, por lo que se confirma que la precisión para los patrones de L-Ramnosa es bastante baja.

Los resultados de este método para las muestras de pectinas comerciales hidrolizadas con los diferentes ácidos se presentan en las *tablas 39, 40, 41 y 42*, expresados como miligramos de azúcar neutro por cada gramo de pectina. Estos resultados se han obtenido al analizar diferentes muestras de pectinas comerciales por triplicado en el cromatógrafo HPLC con las medidas cromatográficas que se mencionan en el *apartado 3.4.3 "Determinación de azúcares neutros mediante HPLC"* tras ser sometidas a hidrólisis por los dos métodos diferentes, el método usando ácido sulfúrico y el método usando ácido trifluoroacético. Se realizan las medias, obteniendo un resultado final expresado en mg de azúcares totales/g de pectina y se calculan los parámetros de precisión.

**Tabla 39 Resultados del método mediante HPLC de la pectina comercial Special Ingredients**

<b>Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)</b>	<b>mg D-Glucosa /g pectina TFA</b>	<b>mg D-Glucosa /g pectina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>
muestra 1	0	381,91
muestra 2	0	362,20
muestra 3	0	358,23
<b>Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)</b>	<b>mg D-Galactosa /g pectina TFA</b>	<b>mg D-Galactosa /g pectina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>
muestra 1	0	0,10
muestra 2	0	0,68
muestra 3	0	0,57
<b>Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)</b>	<b>mg ácido D-Galacturónico /g pectina TFA</b>	<b>mg ácido D-Galacturónico /g pectina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>
muestra 1	617,53	286,07
muestra 2	457,07	279,77
muestra 3	873,40	276,97
<b>Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)</b>	<b>mg L-Arabinosa /g pectina TFA</b>	<b>mg L-Arabinosa /g pectina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>
muestra 1	14,30	16,08
muestra 2	7,61	12,20
muestra 3	12,52	12,85
<b>Concentración Pectina Special Ingredients (mg/L)</b>	<b>mg L-Ramnosa /g pectina TFA</b>	<b>mg L-Ramnosa /g pectina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>
muestra 1	40,34	4,47
muestra 2	31,74	4,46
muestra 3	59,81	4,56

**Tabla 40 Resultados promediados de los monosacáridos y precisión del método mediante HPLC de la pectina comercial Special Ingredients**

<b>Azúcares neutros en Special Ingredients (mg/L) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Media mg azúcar neuro/g pectina</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Desviación Estándar Relativa</b>	<b>Coefficiente de Variación %</b>	<b>Varianza</b>
D-Glucosa	367,45	12,68	0,03	3,45	1,61E+02
D-Galactosa	0,45	0,31	0,69	69,24	9,75E-02
ácido D-Galacturónico	210,70	4,66	0,02	2,21	2,17E+01
L-Arabinosa	10,28	2,08	0,20	20,25	4,33E+00
L-Ramnosa	3,37	0,42	0,12	12,32	2,83E-03
<b>Azúcares neutros en Special Ingredients (mg/L) TFA</b>	<b>Media mg azúcar neuro/g pectina</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Desviación Estándar Relativa</b>	<b>Coefficiente de Variación %</b>	<b>Varianza</b>
D-Glucosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
D-Galactosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
ácido D-Galacturónico	487,00	209,98	0,43	43,12	4,41E+04
L-Arabinosa	8,61	3,47	0,40	40,29	1,20E+01
L-Ramnosa	32,97	14,38	0,44	43,62	2,07E+02

Los resultados de los parámetros de precisión de los azúcares neutros tras la hidrólisis con ácido sulfúrico son mejores con respecto a los obtenidos utilizando como ácido para la hidrólisis con TFA. Dentro de los resultados de la hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el análisis de la D-Galactosa presenta los peores resultados (0.45 mg galactosa/g pectina y CV=69,24%) en cuestión de cantidades y de CV, en comparación con el resto de monosacáridos neutros, que dan mejores resultados de precisión. Sin embargo, con la hidrólisis de TFA no se obtuvieron resultados para los monosacáridos D-Glucosa y D-Galactosa y para los que se obtuvieron los parámetros de

precisión no son buenos (ácido galacturónico CV=43,12%, S=±209,98; arabinosa CV=40,29, S=±3,47; ramnosa CV= 43,62%, S=±14,38).

**Tabla 41 Resultados del método mediante HPLC de la pectina comercial Sigma**

Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg D-Glucosa /g pectina TFA	mg D-Glucosa /g pectina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
muestra 1	0	268,04
muestra 2	0	276,89
muestra 3	0	-
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg D-Galactosa /g pectina TFA	mg D-Galactosa /g pectina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
muestra 1	0,26	0,000
muestra 2	0	0,000
muestra 3	0	-
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg ácido D-Galacturónico /g pectina TFA	mg ácido D-Galacturónico /g pectina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
muestra 1	1,92	345,25
muestra 2	224,76	356,32
muestra 3	1,27	-
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg L-Arabinosa /g pectina TFA	mg L-Arabinosa /g pectina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
muestra 1	0,00	0,39
muestra 2	0,00	0,42
muestra 3	0,00	-
Concentración Pectina Sigma (mg/L)	mg L-Ramnosa /g pectina TFA	mg L-Ramnosa /g pectina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
muestra 1	7,36	0,00
muestra 2	0,00	0,00
muestra 3	0,00	-

**Tabla 42 Resultados promediados de los monosacáridos y precisión del método mediante HPLC de la pectina comercial Sigma**

Azúcares neutros en Sigma (mg/L) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Media mg azúcar neutro/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
D-Glucosa	272,47	6,25	0,02	2,30	3,91E+01
D-Galactosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
ácido D-Galacturónico	233,86	7,83	0,03	3,35	6,13E+01
L-Arabinosa	0,27	0,02	0,07	7,21	3,74E-04
L-Ramnosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
Azúcares neutros en Sigma (mg/L) TFA	Media mg azúcar neutro/g pectina	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
D-Glucosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
D-Galactosa	0,09	0,15	0,00	0,00	2,28E-02
ácido D-Galacturónico	56,99	128,84	2,26	226,09	1,66E+04
L-Arabinosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
L-Ramnosa	1,84	4,25	2,31	230,94	1,81E+01

Al igual que ocurre con los resultados de la muestra de pectina Special Ingredients, los resultados de los parámetros de precisión de los azúcares neutros tras la hidrólisis con ácido sulfúrico son mejores con respecto a los obtenidos utilizando como ácido para la hidrólisis con TFA. Dentro de los resultados de la hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no se obtienen resultados para la D-Galactosa ni para

L-Ramnosa, y dentro de los resultados de la hidrólisis con TFA no se obtienen resultados para la D-Glucosa ni para la L-Arabinosa.

A continuación, se presentan los resultados de los porcentajes de recuperación para cada monosacárido neutro tras ser sometidos todos a hidrólisis por ácido sulfúrico y ácido trifluoroacético en las *tablas 43, 44, 45, 46, 47 y 48*. Los resultados proceden de realizar la hidrólisis por duplicado de los monosacáridos con concentraciones 1 y 3 g/L con los diferentes ácidos. Se realizan las medias, obteniendo un resultado final expresado en porcentaje de recuperación por monosacárido y se calculan los parámetros de precisión.

**Tabla 43 Resultados del porcentaje de recuperación del método mediante HPLC con hidrólisis de ácido sulfúrico**

Concentración Monosacárido 3 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Concentración monosacárido previo hidrólisis (g/L)		Concentración monosacárido posterior hidrólisis (g/L)		Porcentaje Recuperación %	
D-Glucosa	3,58	3,64	3,08	3,21	86,00	88,19
L-Ramnosa	3,59	3,60	2,47	3,43	68,66	95,29
D-Galactosa	3,48	3,60	2,57	2,81	73,86	78,00
L-Arabinosa	3,53	3,67	3,84	3,68	108,59	100,07
Ácido D-Galacturónico	3,49	3,58	1,49	1,59	42,60	44,55
Concentración Monosacárido 1 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Concentración monosacárido previo hidrólisis (g/L)		Concentración monosacárido posterior hidrólisis (g/L)		Porcentaje Recuperación %	
D-Glucosa	1,18	1,20	1,13	1,03	95,83	85,69
L-Ramnosa	1,17	1,25	0,60	1,06	51,58	84,59
D-Galactosa	1,20	1,22	0,91	1,02	75,39	82,98
L-Arabinosa	1,21	1,20	1,47	1,10	121,43	91,53
Ácido D-Galacturónico	1,19	1,19	0,49	0,51	41,16	43,00

**Tabla 44 Promedio del porcentaje de recuperación a 1 y 3g/L por monosacárido del método mediante HPLC con hidrólisis de ácido sulfúrico**

Concentración Monosacárido 3 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Media porcentaje recuperación monosacárido	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
D-Glucosa	87,10	1,55	0,02	1,78	2,40E+00
L-Ramnosa	81,98	18,83	0,23	22,97	3,55E+02
D-Galactosa	75,93	2,93	0,04	3,86	8,59E+00
L-Arabinosa	104,33	6,03	0,06	5,78	3,63E+01
Ácido D-Galacturónico	43,57	1,38	0,03	3,16	1,89E+00
Concentración Monosacárido 1 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Media porcentaje recuperación monosacárido	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
D-Glucosa	90,76	7,17	0,08	7,90	5,14E+01
L-Ramnosa	68,08	23,34	0,34	34,28	5,45E+02
D-Galactosa	79,19	5,37	0,07	6,78	2,88E+01
L-Arabinosa	106,48	21,14	0,20	19,86	4,47E+02
Ácido D-Galacturónico	42,08	1,30	0,03	3,09	1,69E+00

**Tabla 45 Resultado final de los porcentajes de recuperación de cada monosacárido del método mediante HPLC con hidrólisis de ácido sulfúrico**

Resultado final % Rec por monosacárido	Media total porcentaje recuperación monosacárido	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
D-Glucosa	88,93	2,59	0,03	2,91	6,71E+00
L-Ramnosa	75,03	9,83	0,13	13,10	9,65E+01
D-Galactosa	77,56	2,30	0,03	2,97	5,30E+00
L-Arabinosa	105,40	1,52	0,01	1,44	2,31E+00
Ácido D-Galacturónico	42,83	1,06	0,02	2,47	1,12E+00

Los resultados ofrecidos son bastante buenos, por lo visto se han obtenido porcentajes de recuperación elevados (>75%), exceptuando para el ácido galacturónico, el cual se ha podido recuperar menos de la mitad del producto inicial (42,83%). Sin embargo, debido a que la arabinosa presenta un porcentaje de recuperación excesivo, por lo que se puede suponer que la señal de la arabinosa se solapa con otras señales de otros monosacáridos a los que analizamos

(por ejemplo, xilosa [33]), señal indicadora de que la columna cromatográfica no separa estos compuestos adecuadamente. Por otro lado, los parámetros de precisión son excelentes, destacando la ramnosa por poseer los valores más elevados y con una diferencia apreciable.

**Tabla 46 Resultados del porcentaje de recuperación del método mediante HPLC con hidrólisis de ácido trifluoroacético**

Concentración Monosacárido 3 g/L TFA	Concentración monosacárido previo hidrólisis (g/L)		Concentración monosacárido posterior hidrólisis (g/L)		Porcentaje Recuperación %	
	D-Glucosa	10,53	9,07	5,47	4,31	51,95
L-Ramnosa	10,70	8,53	0,00	0,00	0,00	0,00
D-Galactosa	10,35	8,00	3,19	3,25	30,80	40,67
L-Arabinosa	10,35	9,07	17,26	16,52	166,71	182,16
Ácido D-Galacturónico	10,53	8,27	1,79	1,96	17,01	23,73
Concentración Monosacárido 1 g/L TFA	Concentración monosacárido previo hidrólisis (g/L)		Concentración monosacárido posterior hidrólisis (g/L)		Porcentaje Recuperación %	
	D-Glucosa	1,82	2,86	1,57	2,62	86,19
L-Ramnosa	1,82	2,73	14,66	28,88	806,4	1059,0
D-Galactosa	1,91	3,51	0,00	0,00	0,00	0,00
L-Arabinosa	1,82	3,64	0,01	0,00	0,61	0,04
Ácido D-Galacturónico	1,91	2,73	1,15	1,80	60,23	65,83

**Tabla 47 Promedio del porcentaje de recuperación a 1 y 3g/L por monosacárido del método mediante HPLC con hidrólisis de ácido sulfúrico**

Concentración Monosacárido 3 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Media porcentaje recuperación monosacárido	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	D-Glucosa	49,73	3,14	0,06	6,31
L-Ramnosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
D-Galactosa	35,73	6,97	0,20	19,51	4,86E+01
L-Arabinosa	174,43	10,93	0,06	6,26	1,19E+02
Ácido D-Galacturónico	20,37	4,75	0,23	23,31	2,26E+01
Concentración Monosacárido 1 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Media porcentaje recuperación monosacárido	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	D-Glucosa	88,89	3,81	0,04	4,29
L-Ramnosa	932,68	178,63	0,19	19,15	3,19E+04
D-Galactosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00E+00
L-Arabinosa	0,33	0,40	1,24	123,78	1,62E-01
Ácido D-Galacturónico	63,03	3,96	0,06	6,28	1,57E+01

**Tabla 48 Resultado final de los porcentajes de recuperación de cada monosacárido del método mediante HPLC con hidrólisis de ácido sulfúrico**

Resultado final % Rec por monosacárido	Media total porcentaje recuperación monosacárido	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
D-Glucosa	69,31	27,68	0,40	39,94	7,66E+02
L-Ramnosa	466,34	659,50	1,41	141,42	4,35E+05
D-Galactosa	17,87	25,27	1,41	141,42	6,38E+02
L-Arabinosa	87,38	123,11	1,41	140,89	1,52E+04
Ácido D-Galacturónico	41,70	30,17	0,72	72,34	9,10E+02

En el caso de la hidrólisis con TFA los resultados no son tan buenos como los obtenidos utilizando ácido sulfúrico. Para la glucosa, galactosa, arabinosa y ácido galacturónico los porcentajes de recuperación son menores, clara señal de que se ha perdido producto durante la hidrólisis (69,31%, 17,87%, 87,38% y 41,70%, respectivamente). Dada esta tendencia se puede presuponer que, a pesar de obtener un porcentaje de recuperación elevado la arabinosa, está se encuentra solapada con otras señales de otros monosacáridos (como la xilosa [33]). Cabe destacar además que la ramnosa proporciona un porcentaje de recuperación de 0% con una concentración de 3g/L, y, por el contrario, hay una recuperación de 932% con una concentración de 1g/L, resultado que carece de sentido. A una concentración de 1 g/L la galactosa también presenta una recuperación del 0%. El ácido galacturónico obtiene un resultado muy similar al

obtenido por hidrólisis con ácido sulfúrico. Por último, los parámetros de precisión en general son bastante malos, por lo que podemos concluir que el uso de TFA para hidrólisis queda descartado.

#### 4.3.8. Determinación de azúcares neutros. Resumen de los resultados

A la vista de los resultados obtenidos la hidrólisis con ácido sulfúrico proporciona resultados de precisión mucho más adecuados que utilizando TFA como reactivo para hidrólisis, por lo que se puede considerar que es más efectivo realizar hidrólisis con  $H_2SO_4$  (en el apartado 5. “*Discusión de los resultados*” se razonará porque no es el caso contrario, puesto que el ácido sulfúrico tiene un poder de oxidación mayor que el TFA y por lo tanto tendría que degradar más los azúcares). Con las muestras de pectina de Special Ingredients se han detectado y cuantificado más monosacáridos que con respecto a la pectina Sigma. Respecto a la linealidad y linealidad de respuesta de los diferentes monosacáridos, el método cromatográfico es aceptado como válido, a pesar de que los parámetros de precisión de las rectas de calibración presentan malos resultados para los azúcares L-Arabinosa, L-Ramnosa y ácido D-Galacturónico.

#### 4.4. Determinación del grado de esterificación. Validación del análisis volumétrico.

##### 4.4.1. Precisión de los resultados del grado de esterificación.

Los resultados del grado de esterificación para las diferentes muestras de pectinas comercial y la muestra de pectina extraída se presentan en las *tablas 49 y 50*, expresados porcentaje de grado de esterificación, donde cada muestra se analizó por triplicado. Estos resultados provienen de medir los diferentes volúmenes utilizados en la valoración del grado de esterificación ( $V_1$  y  $V_2$ ). Se realizan las medias, las cuales representan el resultado final, y se calculan los parámetros de precisión.

**Tabla 49 Resultados del grado de esterificación de las 3 muestras de las diferentes pectinas**

<b>Medidas Pectina</b>	<b>Volumen 1 (mL)</b>	<b>Volumen 2 (mL)</b>	<b>Grado</b>
<b>Special Ingredients (mg/L)</b>			<b>Esterificación %</b>
medida 1	1,10	2,30	67,65
medida 2	1,10	2,18	66,46
medida 3	1,15	2,75	70,51
<b>Medidas Pectina</b>	<b>Volumen 1 (mL)</b>	<b>Volumen 2 (mL)</b>	<b>Grado</b>
<b>Sigma (mg/L)</b>			<b>Esterificación %</b>
medida 1	4,95	4,80	49,23
medida 2	5,10	4,15	44,86
medida 3	5,15	4,10	44,32
<b>Medidas Pectina</b>	<b>Volumen 1 (mL)</b>	<b>Volumen 2 (mL)</b>	<b>Grado</b>
<b>Extraída (mg/L)</b>			<b>Esterificación %</b>
medida 1	14,60	2,10	12,57
medida 2	17,40	1,60	8,42
medida 3	15,70	1,80	10,29

**Tabla 50 Resultados y parámetros de precisión del grado de esterificación de las 3 muestras de pectinas**

Resultado final grado esterificación	Media total grado esterificación	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
Special Ingredients	68,21	2,08	0,03	3,05	4,34
Resultado final grado esterificación Sigma	Media total grado esterificación	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	46,14	2,69	0,06	5,83	7,24
Resultado final grado esterificación extraída	Media total grado esterificación	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Coefficiente de Variación %	Varianza
	10,43	2,08	0,20	19,95	4,33

Los parámetros de precisión para las diferentes muestras de pectina comercial y de pectina extraída de la pulpa de remolacha son considerablemente buenos, ya que las S son pequeñas (exceptuando el valor de la muestra de pectina extraída, que es elevado con respecto a su valor de grado de esterificación) (Special Ingredients  $S=\pm 2,08$ ; Sigma  $S=\pm 2,69$ ; pulpa remolacha  $S=2,08$ ) y los CV también son buenos, por debajo de 30% (Special Ingredients  $CV=3,05\%$ ; Sigma  $S=5,83\%$ ; pulpa remolacha  $S=19,95\%$ ), a pesar de que cada muestra posea diferentes grados de esterificación ya que cada pectina tiene una fuente de extracción diferente, que dependerá del subproducto hortícola que haya usado cada comercial para extraer la pectina. El resultado más destacable es el obtenido por la muestra de pectina extraída de remolacha, que tiene menor precisión que las pectinas comerciales.

## 5. Discusión de los resultados

- Determinación de ácido D-galacturónico

Los resultados de los parámetros de precisión del contenido en ácido galacturónico (expresado como mg ácido galacturónico/g pectina) son bastante buenos cuando se aplica el método de Melton Smith (Special Ingredients:  $S= \pm 13,55$  y  $CV= 7,62\%$ ; Sigma:  $S= \pm 57,06$  y  $CV= 19,07\%$ ). Existe una enorme diferencia en las cantidades de ácido galacturónico entre las muestras de pectinas comerciales y pectina de remolacha (Special Ingredients: 177,89 mg ácido galacturónico/g pectina; Sigma: 299,22 mg ácido galacturónico/g pectina; Remolacha: 14,78 mg ácido galacturónico/g pectina). Esto puede deberse a que existe dificultades a la hora de disolver las muestras de pectina en ácido sulfúrico. Además, puede ser que la columna vertebral de la pectina que contiene el ácido galacturónico no haya reaccionado completamente con el tetraborato durante el proceso de calentamiento en la hidrólisis [27]. Otra investigación [4] presenta resultados de porcentaje de ácido galacturónico de pectina extraída y pectina pura bastante superiores a lo que son los datos presentados en este trabajo (47,70% en pectina de pulpa de remolacha y 50,73% en pectina pura, mientras que las pectinas Sigma tienen 29,92% y Special Ingredients tiene 17,79%). Conociendo que el ácido galacturónico compone >65% de la pectina [4], razonamos que el proceso de hidrólisis no permitió separar adecuadamente el ácido galacturónico a sus formas monoméricas de las cadenas pectídicas en las muestras de pectinas comerciales y de pulpa de remolacha.

Los resultados del método de Anthon-Barret (-14,17 mg ácido galacturónico/g pectina Sigma y -17,21 mg ácido galacturónico/g pectina Special Ingredients) pueden deberse a que el ácido galacturónico no pudo reducir el sulfato de cobre a pH 4,8, provocando que la lectura espectrofotométrica tras añadir el reactivo de Folin fueran menores que las lecturas de la muestra en blanco. El reactivo de Folin-Ciocalteu forma una intensa coloración ante la presencia del cobre reducido por azúcares o proteínas, cosa que no ocurrió con las muestras de pectinas comerciales, pero sí con los patrones de ácido D-Galacturónico. Esto puede dar a pensar que las pectinas comerciales contenían otros compuestos interferentes (ej.: lípidos) que

bloqueaban la reducción del sulfato de cobre y, por lo tanto, provocaban la falta de coloración y absorbancia. [6].

El procedimiento del método de Filisetti-Cozzi y Carpita sin la adición de sulfamato potásico y tetraborato sódico o, dicho de otra forma, el procedimiento “en crudo” dio lugar a unos resultados muy elevados para ambas muestras de pectinas comerciales (1551,35 mg ácido galacturónico/g pectina Sigma y 953,94 mg ácido galacturónico/g pectina Special Ingredients). Estos valores enormes pueden justificarse por la interferencia del resto de monosacáridos que componen la pectina, y que en presencia de m-hidroxifenil, provocaran un efecto aditivo en los resultados de la absorbancia cuando se quiso medir las cantidades de ácido D-galacturónico. El efecto de añadir el sulfamato potásico en el proceso antes de calentar la muestra es de evitar una mayor absorbancia o turbidez en la mezcla de muestra y disolución por la presencia de otros monosacáridos, y el efecto de añadir el tetraborato sódico aumenta la sensibilidad de detección de ácidos urónicos [26]. Dicha combinación es lo que provoca que el método de Melton-Smith proporcione resultados más auténticos cuando se añaden dichos reactivos.

- Determinación de azúcares totales

Aunque los dos métodos son aceptablemente válidos para cuantificar azúcar total (expresado como la cantidad total de D-glucosa), quien presenta los mejores resultados de validación es el método que implica el reactivo fenol. Otras publicaciones [18] han realizado una serie de propuestas en el que el orden de adición del fenol y del sulfúrico sean intercambiados, al igual que los volúmenes de reacción, dando lugar a resultados de calibración similares. Además, se propone eliminar el uso del fenol para reducir costos y evitar exposiciones prolongadas a esta sustancia nociva. En comparación con el reactivo antrona, el reactivo fenol cumple mejor con esas dos condiciones.

Si se comparan estos datos de D-glucosa con los obtenidos por el método cromatográfico tras someter a las pectinas comerciales a una hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  se aprecia que la pectina de Special Ingredients contiene mayor cantidad de glucosa con respecto a la pectina Sigma (427,65 mg azúcar total/g pectina método fenol; 367,45 mg azúcar total/g pectina método HPLC). Que el método del reactivo fenol presente en general valores superiores a los de la técnica cromatográfica es debido a que el fenol reacciona con los HMF, derivados de las hexosas al reaccionar con ácidos fuertes, por lo que en las medidas de absorbancia no solo se mide la D-glucosa con el fenol, sino además otros monosacáridos, por lo que podemos considerar por válido que se está midiendo el contenido en azúcares totales de las pectinas [18].

- Determinación de azúcares neutros

Los resultados han demostrado que utilizar ácido sulfúrico para la hidrólisis en condiciones de altas temperaturas y concentraciones ha sido considerablemente más eficaz que la hidrólisis realizada con ácido trifluoroacético, donde hay una clara diferencia en los resultados de los dos métodos (ver *tablas 40 y 42*). Durante el proceso de hidrólisis de TFA utilizando el sistema de rotavapor ocurren pérdidas de volumen y muestra que no tienen sentido que sean debidas al TFA. Si le atribuimos dichas pérdidas por la acidez del TFA, el ácido sulfúrico presenta valores de pKa mucho menores que los del TFA, lo que se traduce como que el  $H_2SO_4$  es más ácido y oxidante y se perdería gran parte de los monosacáridos. Sin embargo, los resultados de los porcentajes de recuperación demuestran que los monosacáridos se han degradado mucho menos con  $H_2SO_4$  y bastante más con TFA. Otras investigaciones sostienen el uso de dos ácidos de fuerza débil y fuerte en un proceso de dos pasos, usando ácidos débiles como TFA para poder abrir las cadenas que se encuentren entrelazadas y, a continuación, usar ácidos más fuertes

como el  $H_2SO_4$  para liberar completamente todos los monosacáridos de las cadenas peptídicas [34]. En dicha investigación se demostró que una hidrólisis de dos pasos usando ambos ácidos favorecía la obtención de resultados más elevados respecto a la hidrólisis de un solo paso en la que solo se usa ácido sulfúrico en la hidrólisis (Ej: Contenido de ácido galacturónico en muestra de pectina en un solo paso =  $5,1\% \pm 1,7$ ; Contenido de ácido galacturónico en muestra de pectina en dos pasos =  $24,5\% \pm 5,3$ ). Se puede asumir que o bien el TFA no tiene el poder suficiente para separar los monosacáridos de las cadenas peptídicas y es necesario a continuación el uso de un ácido más fuerte o bien que ha habido errores sistemáticos causados por el uso del rotavapor en la eliminación de los restos del ácido.

Si estos resultados son comparados con los métodos validados en este trabajo, en concreto con los métodos validados para azúcar total (glucosa) y ácido galacturónico, se puede observar que, para el ácido galacturónico el método de Melton-Smith presenta una mayor concentración de ácido galacturónico en la pectina comercial Sigma que en los resultados obtenidos por HPLC hidrolizando con  $H_2SO_4$  (299,22 mg ácido galacturónico/g pectina Melton; 233,86 mg ácido galacturónico/g pectina HPLC  $H_2SO_4$ ), pero ocurre lo contrario con la pectina de Special Ingredients ((177,89 mg ácido galacturónico/g pectina Melton; 210,70 mg ácido galacturónico/g pectina HPLC  $H_2SO_4$ ). Hidrolizando con  $H_2SO_4$  proporciona una mayor precisión de los resultados que el método de Melton-Smith, lo cual demuestra la buena precisión que presentan los métodos cromatográficos ( $S = \pm 13,55$  y  $CV = 7,62\%$  Melton Sigma;  $S = \pm 13,55$  y  $CV = 7,62\%$  Melton Special Ingredients;  $S = \pm 7,83$  y  $CV = 7,21\%$  HPLC  $H_2SO_4$  Sigma;  $S = \pm 4,66$  y  $CV = 2,21\%$  HPLC  $H_2SO_4$  Special Ingredients).

Si se comparan los resultados obtenidos en cuanto cantidad de azúcares totales aplicados por los métodos del fenol y el método de HPLC con hidrólisis de  $H_2SO_4$  el primer método presenta más concentración (expresados como mg azúcares totales/g pectina) en la pectina Sigma con respecto al segundo, y en el caso de Special Ingredients ocurre al revés, presentando más cantidad en la pectina Special Ingredients por el método de HPLC (Special Ingredients fenol: 427,65 mg azúcar total/g pectina; Sigma fenol: 353,25 mg azúcar total/g pectina; Special Ingredients HPLC: 592,25 mg azúcar total/g pectina; Sigma HPLC: 296,6 mg azúcar total/g pectina).

A modo de resumen, la pectina comercial Sigma contiene más cantidad de ácido galacturónico, conteniendo dentro de la estructura de la pectina menos variedad de monosacáridos neutros con respecto a la pectina comercial Special Ingredients, que contiene mayor variedad de los azúcares neutros que se han analizado.

- Determinación del grado de esterificación

La pectina comercial Special Ingredients la podemos clasificar como pectinas de alto metoxilo (HM) debido a su valor (68%), mientras que la pectina comercial Sigma y la pectina extraída de la pulpa de remolacha son pectinas de bajo metoxilo (LM) puesto que sus resultados son 46% y 10%, respectivamente. Esta clasificación implicaría que tienen más facilidad para formar geles en un amplio rango de pH (2,0-6,0) y en presencia de iones divalentes, al contrario que la pectina Special Ingredients, donde las pectinas HM tienen un umbral corto de pH (2,0-3,5) y en presencia de una concentración superior a 55% de monosacáridos podría formar geles [13] [30]. La pectina extraída de la pulpa de remolacha presenta un valor que se aleja del rango convencional de bajo metoxilo, que normalmente ronda entre un 50%-20%. Se ha reportado que altas temperaturas de extracción, bajo pH de extracción y tiempos de extracción largos a pH y temperaturas elevadas provocan una disminución del grado de esterificación. Además, otros documentos

certifican que el grado de esterificación de la pectina extraída de la pulpa de remolacha con las mismas condiciones utilizadas en este TFM presentan resultados de 59% mediante valoración volumétrica y 69% mediante análisis FTIR [30], por lo que es posible que se cometieran errores sistemáticos durante el proceso de extracción de las muestras de pulpa proporcionadas.

## 6. Conclusión

En el presente TFM se ha realizado una puesta a punto distintos métodos de ensayo para la caracterización de pectinas comerciales y pectinas extraídas de residuos agroalimentarios. Las principales conclusiones del trabajo, de acuerdo con los objetivos establecidos, se presentan a continuación.

- La caracterización de la pectina respecto a la composición de azúcares totales, monosacáridos neutros, ácido galacturónico y grado de esterificación, han sido determinados a través de una serie de ensayos recogidos en la bibliografía después de realizar una revisión bibliográfica en la que se han recopilado los diferentes métodos de análisis utilizados en la caracterización de pectina
- Los resultados obtenidos al aplicar diferentes métodos fueron comparados entre ellos y se escogieron aquellos que fueron validados tras realizar un análisis estadístico de la linealidad, respuesta de la linealidad y parámetros de precisión.
- Respecto a la determinación de ácido D-galacturónico mediante la adición de m-hidroxifenil y tetraborato sódico en ácido sulfúrico, se ha podido demostrar que estos reactivos aumentan la sensibilidad de la absorbancia del ácido D-galacturónico en presencia de otros monosacáridos reductores, capando su interferencia en la medición espectrofotométrica.
- En relación con la determinación de azúcares totales aplicando métodos basados en el uso de antrona y fenol, se concluye que la sustitución de reactivos altamente tóxicos y perjudiciales para la salud humana y medioambiental, como es la antrona, por reactivos más económicos y con menor grado de toxicidad, como el fenol, proporciona también resultados adecuados para poder validar contenidos de azúcares totales en muestras de pectinas comerciales.
- Sobre la determinación de azúcares neutros se ha llegado a la conclusión de que el ácido sulfúrico es un compuesto ideal para realizar hidrólisis acida en condiciones de elevadas temperaturas y concentración, permitiendo hidrolizar las largas cadenas poliméricas que componen la pectina en sus formas monoméricas más simples, permitiendo que puedan ser identificadas y cuantificadas con facilidad mediante instrumentos analíticos como HPLC.
- Finalmente, fueron determinados el grado de esterificación y contenido de ácido galacturónico de muestras extraídas de pulpa de remolacha, cuyos resultados fueron diferentes en comparación con las obtenidos de muestras comerciales. Estos resultados de las pectinas extraídas de residuos agroalimentarios se vieron afectados por el proceso de extracción y la fuente del residuo.

## 7. Bibliografía

[1] Muñoz, A.L. 2016. Caracterización de pectinas industriales de cítricos y su aplicación como recubrimiento de fresas. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Autónoma de Madrid

[Consultado el 16/06/2021] Disponible en:

<https://digital.csic.es/bitstream/10261/176559/1/LabradorTFMpectinasfresas.pdf>

[2] Kyomugasho, C., Christiaens, S., Shpigelman, A., M. Van Loey, A., Hendrickx, M.E. 2014. FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry* 176, 82-90.

[3] Caroço R.F., Kim, B., Santacoloma, P. A., Abildskov, J., Lee, J.H., Huusom, J.K. 2019. Analysis and model-based optimization of a pectin extraction process. *Journal of Food Engineering* 244, 159-169.

[4] Ghoshal, G., Negi, P. 2020. Isolation of pectin from kinnow peels and its characterization. *Food and Bioproducts Processing* 124, 342-353

[5] Mao, G., Wu, D., Wei, C., Tao, W., Ye, X., Robert J., R.J., Orfila, C., Chen, S. 2019. Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I. *Trends in Food Science & Technology* 94, 65-78

[6] Anthon, G.E., Barret, D.M. 2008. Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food Chemistry* 110, 239-247

[7] TodaMateria.Glucosa.2021. [consultado el 12/07/2021] Disponible en:

<https://www.todamateria.com/glucosa/>

[8] Cambronero, M., García, P.A. 1998. Procedimiento para obtención de la L-ramnosa de alta pureza de ramnoglucósidos. Patente de Invención [consultado el 13/07/2021]. Disponible en <https://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/DIIDW:1997427678>

[9] Arabinosa: características, estructura y funciones. 2019. Consultado el 13/07/2021.

Disponible en: <https://www.lifeder.com/arabinosa/>

[10] Loeza-Corte, J.M., Verde-Calvo, J.R., Cruz-Sosa, F., Vernon-Carter, E.J., Huerta-Ochoa, S. 2007. Producción de L-arabinosa a partir de la hidrólisis de la goma de mezquite por un extracto crudo con actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 6, No. 3*, 259-265.

[11] Galactosa. Química.es. 2021. Consultado el 13/07/2021. Disponible en:

<https://www.quimica.es/enciclopedia/Galactosa.html>

[12] Galactose. Biology Online. 2021. Consultado el 13/07/2021. Disponible en:

<https://www.biologyonline.com/dictionary/galactose>

[13] Chen, R., Ratcliffe, I., Williams, P.A., Luo, S., Chen, J., Liu, C. 2021. The influence of pH and monovalent ions on the gelation of pectin from the fruit seeds of the creeping fig plant extraction temperature is a decisive factor for the properties of pectin. *Food Hydrocolloids* 106219

[14] Calvo, M. Pectinas. Bioquímica de los alimentos [consultado el 16/06/2021] disponible en:

<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/pectinas.html>

[15] Romero Pulido, M.ª I. 2003. Hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo. Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen Tannophilus*. Tesis Doctoral. Universidad de

Jaen. Consultado el 12/07/2021. Disponible en:  
<http://ruja.ujaen.es/bitstream/10953/431/1/8484392880.pdf>

- [16] Bai, W., Fang, X., Zhao, W., Huang, S., Zhang, H., Qian, M. 2015. Determination of oligosaccharides and monosaccharides in Hakka rice wine by precolumn derivation high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 23, 645-651.
- [17] Reichembach, L.H., Petkowicz, C.L. 2020. Extraction and characterization of a pectin from coffee (*Coffea arabica* L.) pulp with gelling properties. *Carbohydrate Polymers* 245.
- [18] López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarria, C., Segura-Sánchez, F., Restrepo-Betancur, L.F. 2017. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 180-198
- [19] Melton, L.D., Smith, B.G. 2001. Determination of the uronic acid content of plant cell walls using a colorimetric assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 735-738.
- [20] Buathongjan, C., Israkarn, K., Sangwan, W., Outrequin, T., Gamonpilas, C., Methacanon, P. 2020. Studies on Chemical composition, rheological and antioxidant properties of pectin isolated from Riang (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) pod. *International Journal of Biological Macromolecules* 164, 4575-4582.
- [21] Gharibzahedi, S.M.T., Brennan Smith, B.S., Guo, Y. 2019. Ultrasound-microwave assisted extraction of pectin from fig (*Ficus carica* L.) skin: Optimization, characterization and bioactivity. *Carbohydrate Polymers* 222
- [22] Rahmani, Z., Khodaiyan, F., Kazemi, M., Sharifan, A. 2020. Optimization of microwave-assisted extraction and structural characterization of pectin from sweet lemon peel. *International Journal of Biological Macromolecules* 147, 1107-1115
- [23] Khodaiyan, F., Parastouei, K. 2020. Co-optimization of pectin and polyphenols extraction from black mulberry pomace using an eco-friendly technique: Simultaneous recovery and characterization of products. *International Journal of Biological Macromolecules* 164, 1025-1036.
- [24] Kumar, M., Tomar, M., Saurabh, V., Mahajan, T., Punia, S., Contreras, M.M., Rudra, S.G., Kaur, C., Kennedy, J.F. 2020. Emerging trends in pectin extraction and its anti-microbial functionalization using natural bioactives for application in food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 105, 223-237.
- [25] Shafie, M.H., Yusof, R., Samsudin, D., Gan, C. (2020) Avertroa bilimbi pectin-based edible films: Effects of the linearity and branching of the pectin on the physicochemical, mechanical, and barrier properties of the films. *International Journal of Biological Macromolecules* 163, 1276-1282
- [26] Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C. 1991. Measurement of Uronic Acids without Interference from neutral Sugars. *Analytical Biochemistry* 197, 157-162.
- [27] Ahmed, A.E.R., Labavitch, J.M. 1977. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. Department of Pomology, University of California Davis.
- [28] Santos, E.E., Amaro, R.C., Bustamante, C.C.C., Guerra, M.H.A., Soares, L.C., Froes, R.E.S. 2020. Extraction of pectin from agroindustrial residue with an ecofriendly solvent: use of FTIR

and chemometrics to differentiate pectins according to degree of methyl esterification. *Food Hydrocolloids* 107, 105921.

[29] Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cascara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. 2021. [consultado el 12/07/2021] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6583454>

[30] Adiletta, G., Brachi, P., Riianova, E., Crescitelli, A., Miccio, M., Kostryukova, N. 2020. A simplified Biofinery Concept for the Valorization of Sugar beet Pulp: Ecofriendly Isolation of pectin as a Step Preceding Torrefaction. *Waste and Biomass Valorization* 11, 2721-2733.

[31] Coeficiente de variación de Pearson. Universo Formulas. 2020. [consultado el 12/09/2021] Disponible en: <https://www.universoformulas.com/estadistica/descriptiva/coeficiente-variacion-pearson/>

[32] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

[33] Dupont nutrition biosciences APS. 2000. Utilización de una resina de intercambio de catión débilmente ácida para la separación cromatográfica de hidratos de carbono. Patente de Invención [consultado el 13/09/2021]. Disponible en <https://patentimages.storage.googleapis.com/a3/05/4b/8a897277b966ea/ES2316476T5.pdf>

[34] Shi, H., Wan, Y., Li, O., Zhang, X., Xie, M., Nie, S., Yin, J. 2020. Two-Step Hydrolysis method for monosaccharide composition analysis of natural polysaccharides rich in uronic acids. *Food Hydrocolloids* 101, 105524