



Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta

Optimization of the conditions of pectin extraction from lemon rind french (*Citrus medica*) using response surface methodology

Roger Baltazar Flores, Denil Carbajal Mariños, Nilson Baca Rodríguez, Daniel Salvador Rodríguez *

Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

Recibido 20 octubre 2013. Aceptado 10 de diciembre 2013.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue optimizar la temperatura y el pH en la extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) para maximizar el rendimiento y grado de esterificación, utilizando la metodología de superficie de respuesta. La extracción se realizó mediante hidrólisis ácida con H₂SO₄ durante 60 minutos, teniendo como variables independientes el pH (1,0 - 3,0) y la temperatura (70 - 90°C), y como variables dependientes el rendimiento y el grado de esterificación. Se utilizó el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para realizar la optimización. Los modelos obtenidos para el rendimiento y grado de esterificación fueron validados a través del Análisis de Regresión y ANVA (significativo en ambos casos). Se determinó los valores óptimos (T° = 70-80°C, pH = 1-1,5) a condiciones óptimas de extracción fue obtenido el peso molecular de la pectina de 30666.912 g/mol.

Palabras clave: *Citrus medica*, pectina, limón francés, grado de esterificación, DCCR.

ABSTRACT

The objective of this research was to optimize the temperature and pH of pectin extraction from lemon rind French (*Citrus medica*) to maximize performance and degree of esterification, using response surface methodology. Extraction was carried out by acid hydrolysis with H₂SO₄ for 60 minutes, having as independent variables the pH (1.0 - 3.0) and temperature (70 - 90°C), and as dependent variables the performance and the degree of esterification. The Central Composite Rotational Design (DCCR) was used to perform optimization. The models obtained for performance and degree of esterification were validated through Regression Analysis and ANOVA (significant in both cases). Optimum values (T ° = 70-80 °C, pH = 1-1.5) were determined. The optimum extraction conditions were obtained the molecular weight of the pectin 30666.912 g / mol.

Keywords: *Citrus medica*, pectin, French lemon, degree of esterification, DCCR.

1. Introducción

Huamachuco y sus valles vecinos produce cerca de 0,1 a 0,5 toneladas cáscara de limón francés verde (*Citrus medica*), cuyo jugo es utilizado en la actividad artesanal del teñido de telas y para la acidificación de bebidas refrescantes. El residuo principal de estos procesos artesanales es la cáscara, la cual termina desechándose. Sin embargo, de éstas cáscaras se pueden

obtener productos de alto valor agregado como las pectinas, que por su capacidad para formar geles son de gran importancia en la industria alimentaria y farmacéutica. La extracción de pectina a partir de cáscaras de limón francés ofrece beneficios tanto ambientales como económicos.

Limón. El verdadero origen del limón es desconocido, aunque algunos lo han

*Autor para la correspondencia
E-mail: dsalvador@unitru.edu.pe

vinculado al noroeste de la India. Se asume que se introdujeron en el sur de Italia en el año 200 d.C. y que fueron cultivados en Iraq y Egipto en el año 700 d.C. y que alcanzó Sicilia antes del año 1000 y China entre 760 y 1297 d.C., los árabes lo distribuyeron ampliamente en la región del Mediterráneo entre 1000 y 1150 d.C. Era apreciado por sus virtudes medicinales en el palacio del Sultán de Egipto y Siria en el período 1174-1193 d.C. Cristóbal Colón llevó semillas de limón a la isla La Española en 1493. (Granados y Castañeda, 2013).



Figura 1. Limón Francés (*citrus médica*)

El jugo de limón, fresco, enlatado, concentrado y congelado o deshidratado y en polvo, se utiliza principalmente para hacer limonada, en bebidas carbonatadas, y otras bebidas. También se utiliza para hacer pasteles y tartas, para saborizar pasteles, galletas, cremas, sorbetes, dulces, conservas y productos farmacéuticos. Algunas gotas de jugo de limón, sumado a la nata antes del batido, le dan estabilidad a la crema batida. La cáscara de limón puede ser acaramelada o hecha en almíbar en casa. También se conserva en salmuera y se suministra a los fabricantes de productos de panadería y confitería. Es una fuente de aceite de limón, pectina y ácido cítrico.

Pectina. La pectina fue descubierta en 1790 cuando Vauquelin halló primeramente una sustancia soluble de los zumos de fruta. El científico francés Braconnot continuó el trabajo de Vauquelin y encontró que "una sustancia ampliamente disponible de plantas vivas, tenía propiedades gelificantes cuando se le añadía ácido a su solución". La llamó "pectina ácida" del griego "pectos" que

significa sólido, coagulado (Aza y Mendez, 2011).

La pectina es un polisacárido natural, uno de los constituyentes mayoritarios de las paredes de las células vegetales y se obtiene a partir de los restos de la industria de fabricación de zumos de naranjas, limón, sidra, nopal, cascara de plátano, toronja etc. Es más barato que los otros gelificantes con la excepción del almidón, forman geles en medios ácidos en presencia de cantidades grandes de azúcar (Rankes, 2000). Las sustancias pécticas son un grupo complejo de polisacáridos. Contribuyen a la llamada textura de las frutas, los vegetales y los productos procesados (Hui, 1996).

Se pueden distinguir dos clases principales de sustancias pécticas: los ácidos pectínicos, que tienen una pequeña porción de sus ácidos galacturónicos como ésteres metílicos, y los ácidos pécticos, que sólo contienen moléculas de ácido galacturónico libre de esterificación. Por definición las pectinas son ácidos pectínicos con diferentes grados de esterificación y neutralización, que pueden contener de 200 a 1000 unidades de ácido galacturónico.

Tabla 1. Porcentaje de pectina en frutos (base seca)

Fruto	Pectina (%)
Cítricos	20-35
Manzana	10-15
Girasol	15-25
Remolacha	10-20
Maracuyá	15-20

Fuente. Rojas et al. (2008).

Existen otros compuestos de este tipo, las protopectinas, altamente esterificadas con metanol y muy insolubles en agua, que se encuentran en los tejidos de los frutos y son responsables de su textura rígida.

Localización de la pectina. Las sustancias pécticas se encuentran en la mayor parte de los tejidos vegetales y muy especialmente en los tejidos

parenquimáticos y meristemáticos. En ellos, las zonas más ricas corresponden a la pared primaria de las células y a la lámina media que las separa (Pagán, 1996).

Grado de esterificación. El grado de esterificación dependerá del origen de la pectina y del método utilizado para su extracción. En tal sentido, los grupos carboxilos de los ácidos galacturónicos presentarán un grado variable de esterificación con metanol y a su vez pueden estar parcial o completamente neutralizados por iones de sodio, potasio o amonio. En algunas pectinas, los grupos hidroxilos pueden estar parcialmente acetilados (Turquois *et al.*, 1999).

Pectinas de alto metoxilo. Son aquellas en las cuales más del 50% de los grupos carboxilos del ácido galacturónico del polímero se encuentra esterificado con metanol como se puede ver en la Figura 4. El grado de esterificación de las pectinas de alto metoxilo influye mucho sobre sus propiedades, en particular, a mayor grado de esterificación, mayor es la temperatura de gelificación. Estas pectinas son capaces de formar geles en condiciones de pH entre 2,8 y 3,5 y un contenido de sólidos solubles (*azúcar*) entre 60 y 70% (Rankes, 2000).

Pectinas de bajo metoxilo. Las pectinas de bajo metoxilo (LM) forman geles termorreversibles por interacción con el calcio presente en el medio; el pH y la concentración de sólidos son factores secundarios que influyen en la velocidad y la temperatura de gelificación y además en la textura final del gel. En efecto estas pectinas tienen la propiedad de formar gel cuyo soporte está constituido por una estructura reticular de pectinatos de calcio, mientras su contenido de sólidos solubles puede bajar hasta 2%, y el valor de pH acercarse a la neutralidad. Para la gelificación, por esto, la sola presencia de la pectina y de las sales de calcio es necesaria y suficiente (Hui, 1996).

Inactivación de enzimas pécticas. Con el propósito de hacer más eficiente el proceso de extracción es necesario inactivar las enzimas pécticas, manteniendo la materia prima en agua, con concentraciones cercanas a 300 gramos por litro y calentando hasta ebullición, lo cual contribuye a eliminar suciedades o micro-organismos presentes en la cáscara. Se decanta el agua y la materia prima queda lista para la hidrólisis (Rojas *et al.*, 2008).

Extracción de pectina. La hidrólisis ácida es el método más conocido para obtener pectina, que consiste en someter al sustrato a una cocción en medio ácido, posterior filtración y purificación, con lo cual se logra separar la pectina presente del resto de compuestos de las cáscaras, para luego secarla y molerla hasta tener un fino polvo listo para comercializarlo. A la materia prima se la somete a una hidrólisis ácida, generalmente se proponen valores de temperatura para la extracción de pectina con HCl que varían de 85 a 90°C, pH de 1,6 a 2 y tiempos de extracción de 30 a 60 minutos. Se indica que pectina a partir de corteza de limón se puede extraer con ácido nítrico a pH 1,8 y 80°C durante 60 minutos, además se señala que la influencia de la temperatura, tiempo de extracción y pH sobre las "unidades de gelificación" en pectina de naranja se extraen a aún pH de 1,2; 1,6 y 2 y temperaturas de 75, 85, y 95°C a 20, 40 y 60 minutos respectivamente (Pagán, 1996).

Hidrólisis ácida. Al material sólido se le agrega la misma cantidad de agua usada inicialmente y a esta solución se le agrega ácido sulfúrico, ácido nítrico o, preferiblemente, ácido clorhídrico hasta obtener un pH entre 1 y 3. Cuando se usa ácido clorhídrico del 37%, se calcula que deben usar de 6 a 8 ml de ácido por cada litro de la solución, para alcanzar el pH indicado (Attri y Maini, 1996). El tiempo de calentamiento de la solución es de 60 minutos manteniendo la temperatura en el

valor deseado (70 - 80°C); la agitación permanente debe mantenerse para evitar que el material sólido se deposite en el fondo del tanque de hidrólisis.

Precipitación. En la etapa de precipitación de las pectinas se pueden emplear sales o alcoholes. Se prefieren estos últimos porque al usar las pectinas en la industria de alimentos se evitan residuos, mientras que con las sales es necesario un lavado muy cuidadoso para retirar todo residuo. En la precipitación de las pectinas se recomienda un volumen de alcohol equivalente al 80% de la solución que se va a precipitar. Sin embargo, en ensayos de laboratorio se encontró que disminuyendo el volumen de alcohol a un equivalente el 60% del volumen de la solución no se disminuye el rendimiento de una manera notable y si disminuyen los costos sustancialmente (Rojas *et al.*, 2008). Para esta etapa del proceso se empleará etanol al 95 o 96%.

Se han realizado diversos estudios de la extracción de pectina como por ejemplo la investigación de la actividad solubilizadora de pectina por Protopectinasa-SE, enzima producida por el hongo levaduriforme (*geotrichumkle*) que fue estudiada utilizando como sustrato albedo del limón (parte interna, blanca y esponjosa de la cáscara) y la protopectina (sustancia péctica insoluble en agua, obtenida del mismo tejido). Bajo condiciones óptimas de reacción se obtuvo rendimientos de 37 y 28 g. de pectina/100 g de tejido (base seca) a partir de protopectina y albedo, respectivamente (Arley *et al.*, 2009).

Se realizó un estudio que tuvo como objetivo extracción de pectina de nopal (*opuntia ficus indica*) por medio ácido aplicando dos niveles de temperatura, tiempo y estados de madurez. Los resultados de la espectrometría de infrarrojo confirmaron que la pectina obtenida en condiciones de pH 2 es de bajo metoxilo. La pectina obtenida a pH 3 posee características competitivas dentro

de su tipo para ser destinada a la industria de alimentos (Aza y Méndez, 2011).

Se obtuvo y caracterizó pectina a partir de cáscaras de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción. Se aprovechó los desechos industriales del procedimiento de harina plátano común se extrajo pectina a escala piloto a diferentes valores de pH (1,5 y 3), tiempos de hidrólisis (60 min.) y a 60 y 80°C. La calidad de la pectina extraída se evaluó midiendo el contenido de humedad, cenizas, metoxilo, acidez libre, peso equivalente y el grado de esterificación, aplicando un análisis por espectroscopía de infrarrojo. El resultado de la extracción a pH 1,5 a 80°C presentó una composición máxima en base seca (23,06% p/p), pero con mayor contenido de cenizas, humedad y de coloración muy oscura (1,7 y 6,8%). La pectina obtenida a pH 3 y temperatura 60°C fue la de mejor calidad según los valores de humedad y contenido de cenizas pero con el más bajo rendimiento. Las condiciones óptimas para un equilibrio entre rendimiento y calidad son pH 1,5 a 60°C debido a que posee características competitivas dentro de su tipo (cenizas 1,3%, humedad 1%, coloración café claro) para ser destinada a la industria de alimentos con un alto rendimiento (18,86%). El resultado de la espectrometría de infrarrojo para la pectina con óptimas condiciones de equilibrio entre calidad y rendimiento, confirmó que es de gelificación rápida. Las pectinas evaluadas son de bajo metoxilo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el contenido de metoxilo. Con referencia las condiciones de laboratorio y al comportamiento de la pectina, se realizó el diseño general, diagrama y descripción detallada de los equipos del proceso de producción de pectina y un análisis económico general en base a los reactivos usados en el laboratorio (Cabarcas *et al.*, 2012).

Otro método utilizado para la liberación de pectina, pero del cual aún no se ha encontrado suficientes reportes de aplicación en cáscara de mango es el

método biológico (Contreras *et al.*, 2003). Éste es considerado un método alternativo que no tienen efectos tan dañinos con el medio ambiente como los métodos químicos y las condiciones de reacción no son tan severas (Contreras *et al.*, 2006). A pesar de esto, tiene la desventaja de ser muy caro y tardado debido al aislamiento enzimático y a los largos tiempos de extracción requeridos para solubilizar la pectina.

Peso molecular. El peso molecular de la pectina, relacionado con la longitud de la cadena, es una característica muy importante de la que dependen la viscosidad de sus disoluciones y su comportamiento en la gelificación de las jaleas. La determinación cuidadosa del peso molecular es difícil, parcialmente debido a la extrema heterogeneidad de las muestras y a la tendencia de las pectinas a agregarse, aún bajo condiciones no favorables a la gelación. Los pesos moleculares de pectinas y su distribución fueron estudiados sistemáticamente por viscosimetría y determinaron que los pesos moleculares variaban de 20000 a 300000 g/mol (Owens *et al.*, 2005).

Aplicaciones de la pectina. La pectina de alto metoxilo preserva a los productos lácteos de la agregación de caseína cuando se calienta a pH inferiores a 4,3. Este efecto se usa para estabilizar los yogurts líquidos. La gelatina ha sido la base tradicional para los postres de jaleas. Las pectinas de alto metoxilo asociadas a otros principios activos, tienen una gran utilización en los tratamientos de gastritis y úlceras, ya que al ser ingerida cubre las paredes estomacales de una especie de película más o menos gelificada, y la protege de hipersecreciones gástricas y biliares. Su acción en la pared intestinal es análoga; además, se añade una acción desintoxicante, debido al poder adsorbente de la macromolécula péctica, que permite la inhibición de toxinas (Navarro y Navarro, 2008).

2. Materiales y métodos

Se empleó frutos maduros de limón francés (*Citrus medica*), provenientes del distrito de Sanagorán, provincia de Sánchez Carrión, región La Libertad, ubicado a una altura de 2670 m.s.n.m. El procedimiento general para la obtención de pectina se observa en la Figura 2, los procesos principales son la inactivación de enzimas pécticas, hidrólisis ácida y precipitación de la pectina.

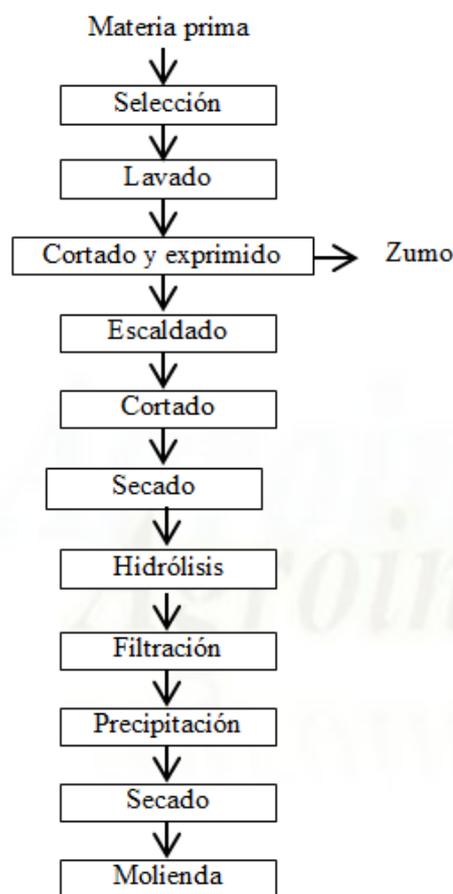


Figura 2. Diagrama de flujo de extracción de pectina.

Se realizó un lavado con agua potable. Luego se cortó por la mitad el fruto y se extrajo el zumo. Se inactivan las enzimas pécticas presentes en la cáscara calentando hasta ebullición durante 5 min. Esto evita que la pectina se deteriore mientras se realizan los diferentes ensayos experimentales.

Se cortó en tiras de 3 mm con la finalidad de exponer más área a la solución extractante.

Se realizó un secado a 50°C por 24h.

La hidrólisis se realizó con H₂SO₄ en baño maría a los diferentes pHs y temperaturas planteados y con agitación durante 60 minutos.

El proceso de filtrado a nivel de laboratorio, se realizó con tela filtrante.

Se usó un volumen del 60% de etanol con respecto a la solución obtenida en el proceso de hidrólisis para lograr el precipitado de la pectina.

La pectina húmeda se secó en horno a 50°C, durante 24 horas, la humedad de la pectina es un factor que incide directamente en la estabilidad de la pectina porque por sus características químicas permite el crecimiento de microorganismos, especialmente hongos. Una pectina muy húmeda es difícil de pulverizar, se adhiere a las superficies y tienen menor estabilidad y tiempo de vida útil. Una pectina muy seca puede ser resistente a la molienda y presentar un color más oscuro. Finalmente la masa sólida resultante se trituró mediante un mortero.

Determinación de rendimiento. El rendimiento se determinó dividiendo el peso de pectina molida entre el peso de cáscara seca por cien, esto se realizó para todos los tratamientos utilizando la siguiente expresión:

$$R = \frac{W2}{W1} * 100$$

Donde:

W1 = Peso de cáscara seca, W2 = peso de la pectina obtenida

Determinación grado de esterificación

El grado de esterificación es un factor importante que caracteriza las cadenas de la pectina de los grupos carboxilos, se determinó usando el método de valoración de Schultz y Schweiger (Rojas *et al.*, 2008), de la pectina obtenida después de

la molienda con la finalidad de evaluar el tipo de pectina, y cuyo protocolo es el siguiente: Se valoran 10 ml de disolución de pectina al 1% con NaOH (hidróxido de sodio) 0,1 Normal, usando fenolftaleína como indicador (valoración A) añadiendo 20 ml de NaOH 0,5 Normal en un tiempo determinado con el fin de desesterificar la pectina. A continuación se añadió 20 ml de HCl (ácido clorhídrico) 0,5 Normal para neutralizar el NaOH. Finalmente la disolución se valora con NaOH 0,1 Normal (valoración B). El grado de esterificación se calculó con la siguiente ecuación:

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

Determinación de peso molecular de pectina. La determinación del peso molecular se realizó a partir de la medición de viscosidad del siguiente modo. Se preparó muestras que contenían 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8% (w/v) de pectina, se disolvió en solución al 0,1 Molar de cloruro de sodio, y se determinó la densidad de las muestras por repetido, se reguló el baño maría a 25 °C. Se colocó 10 ml de solución en el viscosímetro capilar y con estos datos obtenidos se determinó la viscosidad relativa (*nr*) con relación a la solución de cloruro de sodio, luego se graficó la Concentración (C), expresado en (g/100cm³) frente a ((*nr*-1)/C). Por regresión se determinó el término independiente de la ecuación de recta formado, este valor es conocido como viscosidad intrínseca (*ni*). Utilizando la ecuación $ni = 9,55 * 10^{-4}(M)^{0.73}$ se despeja el peso molecular (M) (Rojas *et al.*, 2008).

Diseño de experimentos. Se utilizó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) usando factoriales completos con un planeamiento factorial: 2ⁿ + 2*n + pc, donde n es el número variables independientes y pc es la cantidad de puntos centrales que se repiten. En la tabla 2 se exponen las variables utilizadas en la presente investigación.

Tabla 2. Variables de estudio

Variable	Clase	Dimensión	Indicador
Rendimiento	Dependientes	Porcentaje	%
Grado de esterificación	Dependientes	Porcentaje	%
Temperatura	Independiente	Temperatura	° C
pH	Independiente	Concentración	H+

Para el diseño de experimentos se determinaron los valores axiales ($\pm 1,41$), los valores factoriales (± 1) y el valor central (0) para las 2 variables en estudio.

Tabla 3. Valores utilizados en el DCCR

Variables	Niveles				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X1 Temperatura	70	73	80	87	90
X2 pH	1	1,3	2	2,7	3

Se elaboró un modelo codificado de segundo orden, de acuerdo a:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Donde:

Y: respuesta, en función de los coeficientes significativos (Rendimiento Y1 y Grado de Esterificación Y2).

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$: Coeficientes de regresión (Rodríguez y Iemma, 2005).

En la tabla 4 se presenta el diseño de experimentos utilizado.

Tabla 4. Diseño de experimentos

	X1	X2	Temperatura	pH
T1	-1	-1	72,9	1,3
T2	1	-1	87,1	1,3
T3	-1	1	72,9	2,7
T4	1	1	87,1	2,7
T5	-1,41	0	70	2
T6	1,41	0	90	2
T7	0	1,41	80	1
T8	0	1,41	80	3
T9	0	0	80	2
T10	0	0	80	2
T11	0	0	80	2
T12	0	0	80	2

Para validar el modelo se realizó un ANOVA, determinándose el coeficiente de determinación (R^2), y el F-cal, el cual, si es mayor que el F-tab., indica que el

modelo interpreta adecuadamente la respuesta. Finalmente se construyeron superficies de respuesta para definir las regiones de interés.

3. Resultados y discusión**Optimización de la temperatura y pH**

La pectina se extrajo a temperaturas entre 70 y 90° C y pH entre 1 y 3. Todos los experimentos se realizaron a tiempo constante (60 min), tiempo en el que se obtiene mayor rendimiento según los análisis realizados en otras investigaciones (Pagán, 1996). En total se realizaron 11 experimentos. Los valores de rendimiento y grado de esterificación de las muestras se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de rendimiento (Y₁) y grado de esterificación (Y₂)

Ensayo	X1	X2	Y1	Y2
	Temperatura ° C	pH	Rendimiento (%)	Esterificación (%)
T1	73	1,3	52,2	80
T2	87	1,3	42,8	62
T3	73	2,7	10,5	63,6
T4	87	2,7	13,2	67,3
T5	70	2	11	65,1
T6	90	2	31,7	56
T7	80	1	48	68,5
T8	80	3	14	61,2
T9	80	2	13,2	53,8
T10	80	2	13,1	52,9
T11	80	2	13,1	52,8

A tiempos de extracción constantes, la disminución del pH produce un incremento del rendimiento de la pectina extraída, a excepción del T7 que muestra un rendimiento de 48% por tener un pH demasiado bajo a comparación con el T1 que tiene mayor rendimiento. La tendencia al aumento en el rendimiento se incrementa por la hidrólisis de los enlaces de la protopectina, que pasa a pectina soluble. La temperatura también tiene un papel muy importante en la extracción de pectina por ello generalmente se proponen valores de temperatura para la extracción de pectina que varían de 85 a 90°C, Venturo (2013) indica que las pectinas obtenidas partir de corteza de limón se pueden extraer con ácido nítrico a pH 1,8

y 80°C durante 60 minutos. Pagán (1996) señala que las pectinas de naranja se extraen a un pH de 1,2; 1,6 y 2 y temperaturas de 75, 85, y 95°C a 20, 40 y 60 minutos respectivamente. Por ello al ser un producto aún no estudiado fijamos los parámetros de extracción referenciales recomendados por Venturo (2013), eligiendo pH entre 1-3 y temperatura entre 70 y 90 °C.

El rendimiento de la pectina varía entre 10,5 y 52,2 %, lo que indica que hay altos contenidos de pectina en la cascara de limón francés comparado con pectinas comerciales de cítricos con rendimientos máximos de 35 % y en girasol de 25 % (Tabla 1) obtenido por Rojas *et al.* (2008). El máximo porcentaje de pectina extraída corresponde a la T1 obtenida a 73°C, pH 1,3 y tiempo de 60 minutos.

Cabarcas *et al.* (2012) extrajeron pectina a partir de cáscaras de plátano, trabajando a pH 1,5 y a 80°C, presentó un rendimiento máximo en base seca (23,06%), el mínimo correspondió a la temperatura de 73°C y pH 2,7 y tiempo de 60 minutos, también obtuvo un menor rendimiento de pectina a pH 3 y temperatura 60°C, observando la misma tendencia en nuestros resultados obtenidos. Por tal motivo en materia de rendimiento nos quedamos con el T1 como uno de los mejores procesos.

En cuanto al grado de esterificación, este constituye una propiedad química muy importante relacionada con la velocidad de gelificación y solidificación de las moléculas de pectina, como se detalló en el marco teórico. Los valores del grado de esterificación obtenidos variaron de 80 a

53,8%; sin embargo, en todos los casos los valores obtenidos superaron el 50%, por lo que las muestras de pectina cruda obtenidas fueron de alto grado de esterificación, además, en los rangos de pH de 2 y 3 se produjo un ligero aumento del grado de esterificación entre 53,8 y 65%, lo cual tiene relación con los datos obtenidos al medir la acidez libre, es decir, se disponen de más carboxilos libres que pueden ser esterificados. De igual manera, se puede observar que a pH 1,3 y menor temperatura de hidrólisis el grado de esterificación es mayor, pero a igual pH y temperatura de hidrólisis mayor, el grado de esterificación tiende a disminuir, esto por efecto de la hidrólisis en los enlaces éster de la cadena de polimérica de ácidos galacturónicos. Todas las muestras presentan un alto grado de esterificación. En la tabla 6 se muestra el Análisis de los efectos para el Rendimiento y Grado de esterificación, observándose que la temperatura y el pH, así como sus cuadrados y su interacciones tienen un efecto altamente significativo ($p < 0,05$).

Además se observa que el pH tiene un mayor efecto sobre el rendimiento que la temperatura, por otro lado el pH y la temperatura tienen un efecto similar sobre el grado de esterificación. Attri y Maini (1996) manifestaron que para hidrolizar la protopectina de una matriz, un factor determinante es tener un pH lo suficientemente bajo para hidrolizar la protopectina, además manifestó que a altas temperaturas (70 - 80°C) se obtienen mejores rendimientos.

Tabla 6. Análisis de los Efectos para el Rendimiento y Grado de esterificación

FACTOR	RENDIMIENTO (%)		GRADO DE ESTERIFICACION (%)	
	EFEECTO	VALOR-P	EFEECTO	VALOR-P
Interacción	13,1845	0,000006	53,24439	0,000036
(1) temperatura °C (l)	5,6601	0,000051	-6,75606	0,003273
Temperatura °C (q)	9,8441	0,000024	9,95884	0,002101
(2) pH (l)	-29,6652	0,000002	-5,32778	0,005248
pH (q)	19,3011	0,000006	14,17284	0,001039
l1 b y 2l	6,0500	0,000091	10,85000	0,002567

En la tabla 7 se muestran los Coeficientes de regresión para el rendimiento y grado de esterificación, observándose una alta significancia en los mismos.

Tabla 7. Coeficientes de regresión para el rendimiento y grado de esterificación

Factores	Rendimiento(%)		Esterificación	
	Regresión Coef.	P	Regresión Coef.	P
Intercepto	843,658	0,000015	984,826	0,00103
(1)Temperatura °C(L)	-16,902	0,000022	-18,956	0,00158
Temperatura °C(Q)	0,100	0,000024	0,102	0,00210
(2)pH(L)	-149,357	0,000012	-150,225	0,00105
pH(Q)	19,695	0,000006	14,462	0,00104
1L b y 2L	0,617	0,000091	1,107	0,00257

Rendimiento: $R^2=0,90398$; Adj: 0,8035

Esterificación: $R^2=0,90177$; Adj: 0,8079

(L) = lineal; (Q) = cuadrática; Los coeficientes de regresión para el rendimiento (Y1) y el grado de esterificación (Y2) de la tabla 7 permitieron elaborar un Modelo Matemático de segundo orden, donde fueron considerados todos los factores.

$$Y_1 = 843,658 - 16,902X_1 + 0,1X_1^2 - 149,357X_2 + 19,695X_2^2 + 0,617X_1X_2$$

$$Y_2 = 984,826 - 18,956 X_1 + 0,102 X_1^2 - 150,225 X_2 + 14,462 X_2^2 + 1,107 X_1X_2$$

Donde:

Y_1 = Rendimiento (%)

X_1 = Temperatura °C

Y_2 = Esterificación (%)

X_2 = pH

El valor R^2 , de las ecuaciones polinómicas de segundo orden obtenido para el rendimiento y grado de esterificación fue de 0,90398 y 0,90177 respectivamente, lo que indica que solo el 90% de la variabilidad de los resultados de rendimiento y grado de esterificación son explicadas por los modelos y sólo el 10 % no pueden ser explicados por los mismos. Los altos valores de los coeficientes de correlación R y determinación R^2 , muestran una estrecha concordancia entre los resultados experimentales obtenidos y los valores predichos por los modelos

polinómicos (Ferreira *et al.*, 2003; Abdel *et al.*, 2005). Cuando son cercanos los valores de R (coeficiente de correlación múltiple) a 1; mejor será la correlación entre los valores experimentales y predichos (Wang y Lu, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2000).

En Tabla 8 se muestra el análisis de varianza para los modelos de rendimiento y grado de esterificación. Los modelos resultan ser significativos, es decir, los modelos son adecuados para describir los resultados a través de la superficie de respuesta, se puede afirmar que existe una buena concordancia entre los valores experimentales y los previstos por el modelo.

Tabla 8. Análisis de varianza de rendimiento y grado de esterificación.

	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados Medios	F-cal	F-tab
RENDIMIENTO					
Regresión	2445,470	5,0	489,094	9,387	5,050
Residuos	260,519	5,0	52,104		
Total	2705,989	10,0			
GRADO ESTERIFICACION					
Regresión	610,058	5,0	122,012	9,018	5,050
Residuos	67,651	5,0	13,530		
Total	677,709	10,0			

Sin embargo, para el grado de esterificación los valores son un poco menos significativos debido a que los rangos axiales están muy separados ya que se trabajó con rangos de valores de variables independientes recomendados en investigaciones realizadas en otras materias primas. Se indica que las dos variables estudiadas se encuentran con una tendencia similar al obtenido por Aza y Méndez (2011).

Gráficas de superficie de respuesta

Como se pudo observar en el análisis anterior, los modelos son altamente significativos para la respuesta rendimiento y grado de esterificación, siendo posible construir la superficie de respuesta y definir las regiones de interés (Figuras 3 y 4).

El análisis de la superficie de respuesta y curva de contorno permite definir las condiciones más adecuadas que

maximizan el rendimiento y el grado de esterificación.

En la Figura 3, se observa la superficie de respuesta y curva de contorno que permite definir las condiciones más adecuadas que maximizan los rendimientos, se observa que cuando los valores de pH oscilan entre 1 y 1.5, y la temperatura entre 73 y 90°C, el rendimiento alcanza valores máximos de 52.2 en el T1. Es decir, se necesita menor pH y temperaturas moderadas tal como Cabarcas *et al.* (2012) lo manifiesta en sus conclusiones cuando caracterizó pectina a partir de cáscaras de plátano, este hecho también lo reafirman Campos *et al.* (2010) que obtuvieron pectina de cáscara de limón y toronja.

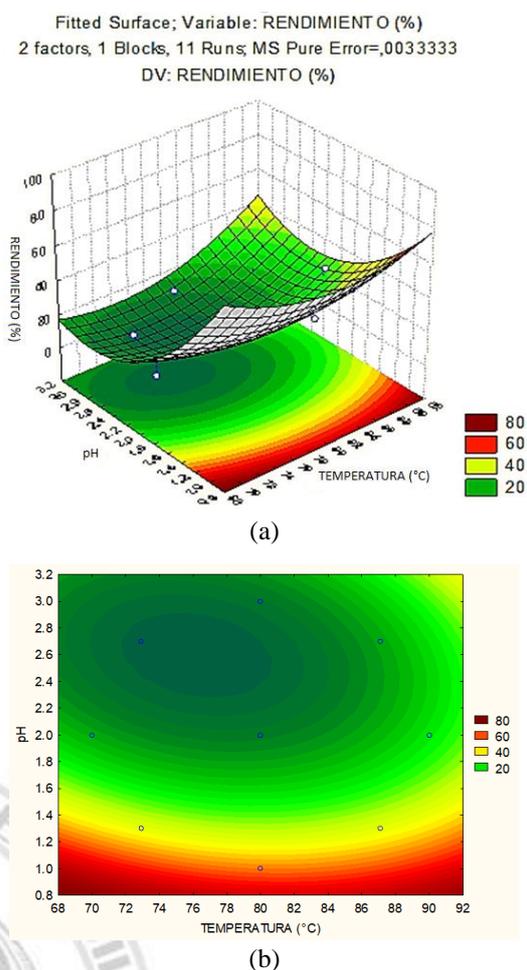


Figura 3. (a) Superficie de respuesta; (b) curvas de contorno para el rendimiento.

En la Figura 3 se verifica que cuando el pH disminuye por debajo de 1 y

disminuye la temperatura la temperatura se mantiene entre 70 y 90°C se maximiza el rendimiento, sin embargo al considerar las temperaturas altas se necesita mayor cantidad de energía para llegar a tales temperaturas lo cual genera un gasto económico innecesario así mismo incurriría en un gasto excesivo de ácido y también originando peligro de hidrólisis excesiva.

En la Figura 4, se verifica que cuando los valores de pH oscilan entre 1 y 1,5 y la temperatura entre 70 y 80 °C; el grado de esterificación alcanza valores mayores de 80%. Es decir, se necesita pH bajos y temperaturas moderadas para alcanzar grados de esterificación altos que indica la buena calidad de pectina.

El grado de madurez de los frutos influye en el rendimiento y grado de esterificación de la pectina. Es así como los frutos verdes tienen un contenido mayor de pectina, ya que por su textura dura su cáscara contiene sustancias pécticas en gran cantidad descrito (Badui, 2006). En este sentido para este estudio se utilizó cáscara de limón francés verde de tal manera que se obtuvo un buen rendimiento y grado de esterificación.

En cuanto al grado de esterificación, este dependerá del origen de la pectina y del método utilizado para su extracción. En tal sentido, los grupos carboxilos de los ácidos galacturónicos presentarán un grado variable de esterificación con metanol y a su vez pueden estar parcial o completamente neutralizados por iones de sodio, potasio o amonio. En algunas pectinas, los grupos hidroxilos pueden estar parcialmente acetilados (Ferreira, 2007).

En la Figura 4 se verifica que cuando el pH disminuye por debajo de 1 y disminuye la temperatura por debajo de 70°C se maximiza el grado de esterificación tendiendo a ser del 100%, sin embargo, llegar a este porcentaje alto en el grado de esterificación incurriría en un gasto excesivo de ácido y también originando peligro de hidrólisis excesiva.

Fitted Surface; Variable: GRADO DE ESTERIFICACION (%)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs, MS Pure Error=,3033333
DV: GRADO DE ESTERIFICACION (%)

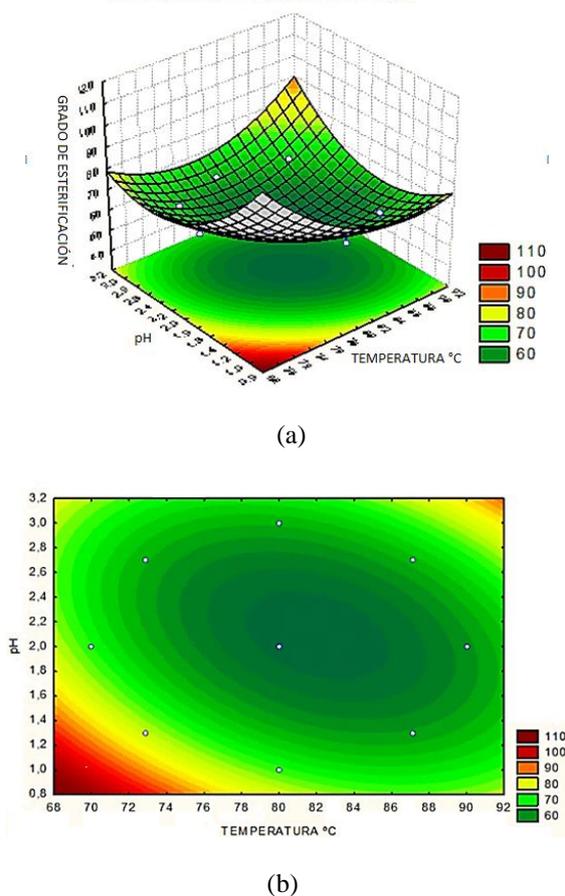


Figura 4. (a) Superficie de respuesta; (b) curvas de contorno para el grado de esterificación.

Nivel óptimo de las variables

Los valores óptimos de las variables independientes, y consecuentemente de las respuestas, fueron obtenidas de los gráficos de superficie de respuesta (Figuras 3 y 4).

Tabla 9. Valores óptimos extracción de pectina por hidrólisis ácida

Variabes	Rango de valores
Temperatura °C	70-80
pH	1-1,5

Como se observa en la Tabla 9 se buscó maximizar rendimientos y maximizar grados de esterificación haciendo la superposición de las superficies de contorno se determina que los valores

óptimos se logran con temperaturas entre 73 y 80°C con un pH entre 1 y 1,5.

Determinación de peso molecular del mejor tratamiento

En la figura 5 se observa la determinación de la viscosidad intrínseca que nos sirvió para determinar el peso molecular de la pectina extraída con mayor rendimiento.

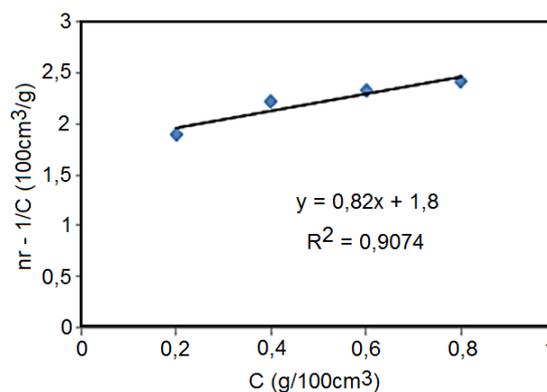


Figura 5. Determinación de la viscosidad intrínseca.

$$1,8 = 9,55 * 10^{-4} (M)^{0,73}$$

$$PM = 30666,9121193 \text{ g/mol.}$$

El peso molecular de la muestra T1 nos muestra que estamos dentro de los pesos moleculares de la pectinas correspondientes entre 20000 a 300000, además tenemos cadenas cortas por su bajo peso molecular según lo descrito por Owens *et al.* (2005).

4. Conclusiones

Es posible extraer pectina a partir de cascara limón francés, tal como se observa en los resultados logrados durante el desarrollo del proceso de investigación. A tiempos de extracción constante, y del pH de 1 a 1,5 y temperatura moderada entre 70 y 80°C producen un incremento del rendimiento de la pectina extraída, y grado de esterificación ya que se incrementa la hidrólisis de los enlaces de la protopectina, que pasa a pectina soluble.

El máximo porcentaje de pectina extraída corresponde a una muestra obtenida a 73° C, pH 1,3 y tiempo de 60 minutos, lo que corrobora la tendencia descrita anteriormente y corresponde a una muestra extraída a temperatura moderada y pH bajo de todas las condiciones ensayadas.

El porcentaje de esterificación varía del 52,2 al 80 %, lo que calificaría a la pectina extraída como de alto metoxilo, además de obtener un peso molecular de $PM=30666,9121193$ g/mol confirmando una pectina de bajo peso molecular.

5. Referencias bibliográficas

- Abdel, Y.; Saeed, H.; Gohar, Y.; Baz, M. 2005. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Proc. Biochem.* 40:1707-14.
- Attri, B.; Maini, S. 1996. Pectin from Galgal (*Citrus pseudolimon* Tan) peel. En: *Bioresource Technology*, 55: 89-91
- Arley, D.; Zapata, Z.; Escobar, G.; Sebastián, F.; Roque, A. 2009. Evaluación de la capacidad de solubilización de pectina de cáscara de limón usando protopectinasa; Vital; *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16(1) :67-74.
- Aza, M.; Méndez, M. 2011. Extracción de pectina de nopal (*Opuntia ficus indica*) por medio ácido aplicando dos niveles de temperatura, tiempo y estados de madurez” Universidad Técnica del Norte. Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Ecuador.
- Badui D. S. 2006. *Química de los Alimentos*. Editorial Pearson. México.
- Campos, F.; Chávez, C.; Figueroa, W.; Luján, A. 2010. Determinación de la relación de dilución (1:5, 1:10) de la cáscara de tres cítricos (naranja, limón y toronja) adecuada sobre el rendimiento de extracción de pectina, Universidad nacional la Molina. Lima.
- Cabarcas, E.; Guerra, A.; Henao, C. 2012. “Extracción y caracterización de pectina a partir de cáscaras de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción”. Universidad de Cartagena. Programa De Ingeniería Química. Cartagena. Colombia.
- Contreras, J.; Banda, L.; Montañez, J. 2003. Extracción enzimática de pectina de mango. *Memorias del X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
- Contreras, J.; Espinoza, J.; Montañez, J.; Charles, A.; Renovato, J.; Aguilar, C.; Rodríguez, R.; Wicker, L. 2006. “Extraction and characterization of pectin from novel sources”. *Advances in Biopolymers. ACS Symposium Series*. 935(14): 215-229.
- Ferreira, S.; Correia, A.; Da Fonseca, M. 2003. Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. *Jour. Mol. Catal. B: Enzymtic*. 21:71-80.
- Ferreira, S. 2007. Pectinas; aislamiento, caracterización y producción a partir de frutas tropicales y de los residuos de su procesamiento industrial; Universidad nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Colombia.
- Granados, D.; Castañeda, A. 2013. *Bioquímica de los alimentos*. Disponible. <http://www.sabelotodo.org/agricultura/frutales/limonfrances.html>.
- Hui, Y. 1996. *Encyclopedia of Food Science and Technology*; John Wiley and Sons Inc.; N.Y. 2039-2043.
- Navarro, G.; Navarro, S. 2008. *Sustancias pecticas: química y aplicaciones*. Secretariado de publicaciones e intercambio científico. Universidad de Murcia (ed.)
- Owens, H.S.; Miers, J.C. y Maclay, W.D. 2005. Distribution of molecular weights of pectin propionates. *J. Colloid. Sci.* 3, 277-291.
- Pagán, G. 1996. *Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón* ISBN: 89-89727-64-3 Depósito legal, S 54-98. Server de publicaciones. Universidad de Lleida.
- Rankes, M. 2000. *Manual de la industria de los alimentos*; ed. Acribia, Zaragoza, España; pp. 393-394; 429.
- Rojas, J.; Perea, A.; Stashenko, E. 2008. Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 16(1): 110-115.
- Rodríguez, M.; Iemma, A. 2005. *Planeamiento de experimentos y optimización de procesos*. Edit. Casa do Pao. Brasil.
- Turquois, I.; Rinaudo, M.; Travel, F.; Heraud, A. 1999. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their

- gelling properties. *Food Hydrocolloids* 13: 255-262.
- Vasconcelos, A.; Barbosa, A.; Dekker, R.; Scarminio, I.; Rezende, M. 2000. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Proc Biochem.* 35:1131-1138.
- Venturo, M. 2013. Influencia de la Temperatura y Tiempo de Extracción en el Rendimiento de Pectina y Porcentaje de Metoxilos en la Cáscara de Limón (*Citrus pseudolimonium*). Tesis de grado. Universidad Nacional del Centro del Perú
- Wang, Y.; Lu, Z. 2005. Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* spp. ACCC 50328. *Proc Biochem.* 40:1043-1051.

