

Potencialidades de especies cítricas como fuentes de pectinas bioactivas asociadas a agroecosistemas cacaoteros.

Potentialities of citric species as sources of bioactive pectins associated to cocoa agroecosystems.

Autores: Lázaro Cotilla-Pelier, María Gallardo-López, Arley Abreu-Romero.

Organismo: Centro de Desarrollo de la Montaña. El Salvador. Guantánamo. Cuba.

E-mail: lazaro@cdm.gtmo.inf.cu

Resumen.

Se estudiaron los contenidos de metoxilo y de ácido anhidro galacturónico de las pectinas extraídas de *Citrus maxima* L. y *Citrus limon* L., así como la influencia del procedimiento de extracción sobre los valores de ambos parámetros de calidad de las pectinas y los rendimientos. Se utilizaron dos procedimientos de extracción basados ambos en la hidrólisis ácida del material vegetal, el primero a pH=2 y posterior evaporación y el segundo a pH=3 y precipitación del producto con alcohol etílico. Las pectinas extraídas a menor pH presentaron los mayores rendimientos, pero menores contenidos de metoxilo y de ácido anhidro galacturónico, en tanto que a mayor pH disminuyeron los rendimientos de pectinas, pero las mismas presentaron mayores contenidos de metoxilo y de ácido anhidro galacturónico. Ambos procedimientos produjeron pectinas que pueden clasificarse como pectinas de alto metoxilo y alta pureza, por lo que se perfilan como materias primas promisorias para el desarrollo de productos bioactivos.

Palabras clave: pectinas, alto metoxilo, ácido anhidro galacturónico, bioactivo.

Abstract.

The contents of methoxyl and anhydrous galacturonic acid in pectin from *Citrus maxima* L. and *Citrus limon* L. were studied, as well as the influence of the extraction procedure on the values of both pectin quality parameters and the yields. Two extraction procedures based on the hydrolysis of the plant material were used, the first at pH=2 and subsequent evaporation and, the second, at pH=3 and precipitation with ethyl alcohol. Pectin extracted at a lower pH, showed the higher yields but the lower contents of methoxyl and anhydrous galacturonic acid, while at a higher pH decreased the pectin yields and the contents of methoxyl and anhydrous galacturonic acid were increased. Both procedures yielded pectin which can be classified as high methoxyl and high purity pectin, being, thus, promissory raw material to developing bioactive substances.

Keywords: pectin, high methoxyl, anhydrous galacturonic acid, bioactive.

Introducción.

Uno de los métodos usados para incrementar la producción de muchos cultivos es la aplicación de sustancias naturales biodegradables que sean capaces de estimular el crecimiento y el rendimiento de las plantas y, a la vez, protegerlas contra el ataque de determinados patógenos.

Por ejemplo, Costales y Núñez (2004) informaron que en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) se obtuvo un producto conocido comercialmente como Pectimorf, preparado a partir de la pectina cítrica y que consiste en una mezcla de oligogalacturónidos bioactivos. El Pectimorf ha demostrado su efecto como enraizador y estimulador del crecimiento de las plantas (Falcón y Cabrera, 2002).

Las pectinas que se comercializan internacionalmente se obtienen principalmente a partir de la cáscara de especies cítricas y de manzanas. Las pectinas comerciales que se extraen de las cáscaras de los cítricos contienen un alto grado de ácidos pectínicos (85-90%), correspondiendo a la protopectina y ácidos pécticos la menor proporción (5-10%) (Casas *et al.*, 2015). Se estima que la cáscara de cacao contiene cantidades de pectinas comparables con las de otras fuentes industriales tales como manzanas y peras (Orozco y Suárez, 2014).

Se han estudiado por varios autores numerosas otras fuentes de pectinas cuyo uso industrial no se ha extendido, pero poseen propiedades químicas, por lo que se perfilan como promisorias desde el punto de vista de las industrias médico -farmacéutica y agrobiológica. Entre estas fuentes pueden citarse el higo (Chaparro *et al.*, 2015), diversas variedades de pasiflora (Montaña, 2016), el mango (Barreto *et al.*, 2017), etcétera.

Sobre esta base se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de evaluar las potencialidades de dos especies de cítricos silvestres, como fuentes para la obtención de pectinas que constituyan el punto de partida para el desarrollo de nuevos productos con efecto bioestimulador sobre cultivos de importancia económica.

Materiales y métodos.

El trabajo se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo de la Montaña en el período comprendido de mayo a octubre de 2017 y para el mismo se seleccionaron las especies *Citrus maxima* L. y *Citrus limon* L., ambas de la familia *Rutaceae* y asociadas a agroecosistemas cacaoteros.

Las colectas se realizaron en plantaciones de cacao pertenecientes a la CCS fortalecida "Marcos Martí", ubicada en la localidad El Olimpo de Monte Ruz, municipio de El Salvador, provincia de Guantánamo. El material colectado consistió en frutos fisiológicamente maduros los cuales deben reunir como requisitos, además, no presentar magulladuras ni partes en estado de descomposición lo cual permite garantizar buenos rendimientos y buena calidad de las pectinas. A los frutos se les retiró manualmente la pulpa y las semillas procediéndose a la separación de los albedos. Estos últimos se congelaron para su conservación hasta el momento de realizar las extracciones.

Extracción de pectinas.

Los procesos de extracción de pectinas a partir del material vegetal se realizaron según dos variantes de extracción, basadas en la hidrólisis ácida del material. Los procedimientos utilizados se describen a continuación:

Variante I

Lavado: Las cortezas se sometieron a un lavado con agua a 60°C para eliminar sustancias solubles en agua caliente, las cuales pueden alterar las características organolépticas del producto extraído.

Inactivación bacteriana: Las cortezas se trataron durante 3 minutos con agua a 100°C. Este proceso se realiza para controlar la proliferación de microorganismos que pueden degradar la materia prima.

Hidrólisis ácida: Las cortezas se sometieron a extracción en un equipo de reflujo con agua acidulada (pH=2) con ácido clorhídrico, en una relación cortezas / agua acidulada de 1/3. El proceso se realizó a una temperatura de 85°C, con agitación constante a 400 rpm durante un tiempo de 80 minutos.

Evaporación: El producto del proceso anterior se evaporó a vacío por el tiempo suficiente para evaporar el 75 % de la carga inicial. Se controló rigurosamente la temperatura, la cual no debe superar los 65°C.

Secado: El concentrado líquido obtenido en el proceso anterior se sometió a un proceso de secado en condiciones de vacío por el tiempo suficiente para secarla totalmente. Para esta operación se extendió el concentrado líquido sobre bandejas plásticas que se colocaron bajo una campana de vacío conectada a la bomba de vacío correspondiente.

Variante II

Preparación de la materia prima: Las cortezas de los frutos se lavaron y se trituraron en un molino de cuchillas con pequeñas cantidades de agua, recuperándose inmediatamente las cortezas desmenuzadas por filtración a través de varias capas de gasa. Las cortezas trituradas se trataron con agua destilada a una temperatura de 95-98°C durante 15 minutos, con el propósito de inactivar las enzimas pectinesterasas que hidrolizan los grupos éster metílicos, así como inactivar la poligalacturonasa que rompe los enlaces glucosídicos entre moléculas galacturónicas y despolimerizan la cadena a fracciones más cortas.

Hidrólisis ácida: Las cortezas se sometieron a extracción en un equipo de reflujo con agua acidulada (pH=3) con ácido clorhídrico, en una relación cortezas / agua acidulada de 1/16. El proceso se realizó a una temperatura de 90-95°C, con agitación constante, durante un tiempo de 90 minutos.

Aislamiento del producto: Se filtró el hidrolizado obtenido en el paso anterior y se exprimió de forma manual a través de varias capas de gasa y se enfrió rápidamente para minimizar la degradación de la pectina por el calor. A la solución péctica se le agregó 1,5 volúmenes de etanol al 95% para precipitar la pectina; posteriormente se filtró sobre varias capas de gasa y se lavó con alcohol. El producto se sometió a un proceso de secado a 60 °C hasta obtener peso constante.

Cálculo de los rendimientos: Se calcularon a partir de la siguiente relación:

$$R = \frac{m}{M} \cdot 100$$

Donde: R= rendimiento en pectina del material vegetal (%).

m= masa de pectina extraída (g).

M= masa de material vegetal inicial (g).

Caracterización química preliminar de las pectinas

Incluyó las siguientes determinaciones:

Porcentaje de metoxilos: Una solución de 0.5g de pectina en 100mL de agua se valoró con solución de hidróxido de sodio 0.1N (meq A). A continuación, se añadieron 25mL de solución de hidróxido de sodio 0.25N, se dejó reposar por 30 minutos y se agregaron 25mL de solución de ácido clorhídrico 0.25N valorándose finalmente con solución de

hidróxido de sodio 0.25N (meq B). El porcentaje de metoxilos se determinó a partir de la siguiente relación:

$$\% \text{ Metoxilos} = \frac{V \text{ (mL)} \times \text{Normalidad} \times 3.1}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

Donde: V (mL) = volumen de solución de hidróxido de sodio consumido en la segunda valoración.

Contenido de ácido anhidro galacturónico (%AAG): Su determinación es esencial para evaluar la pureza de las pectinas. Se determinó a partir de la siguiente relación:

$$\% \text{ AAG} = \frac{176 \times 100 \text{ (meq A+ meq B)}}{\text{mg de pectina}}$$

Donde: meq A= miliequivalentes de hidróxido de sodio en la primera valoración.

meq B= miliequivalentes de hidróxido de sodio en la segunda valoración.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico: Los datos obtenidos durante las determinaciones se sometieron a Análisis de Varianza de clasificación simple, siendo la causa de variación, en todos los casos, el procedimiento de extracción utilizado. Para la estimación de la significación de las diferencias se utilizó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, con un nivel de significación de $p \leq 0.05$.

Resultados y discusión.

La extracción de pectina a partir de *Citrus maxima* L mostró su mayor rendimiento cuando se utilizó la variante I de extracción (pH=2, concentración del producto por evaporación) con diferencia significativa respecto del rendimiento obtenido al emplearse la variante 2 de extracción (pH=3, precipitación del producto con alcohol).

Los porcentajes de metoxilos, sin embargo, mostraron un comportamiento inverso al observado para los rendimientos pues la variante I que permitió la extracción de mayores cantidades de pectina produjo un menor porcentaje de metoxilos en la misma (tabla 1).

Procedimiento de Extracción	Rendimiento (%)	Metoxilos (%)	AAA (%)
Variante I	17.13a	7.18b	78.21b
Variante II	12.19b	11.22a	83.72a
Es x	± 0.21	± 0.23	± 0.32

Tabla 1. Influencia del procedimiento de extracción sobre el rendimiento, el porcentaje de metoxilos y el porcentaje de ácido anhidro galacturónico (AAG) de la pectina extraída de *Citrus maxima* L.*

*Valores con letras diferentes difieren significativamente según Duncan para $p < 0.05$

Este comportamiento de los valores de rendimientos y porcentajes de metoxilos de las pectinas es similar al observado por numerosos autores durante la extracción de pectinas de otras especies tanto de cítricos como de otros tipos, donde comprobaron que a menores valores del pH del agente de extracción se obtienen mejores rendimientos de pectinas pero las mismas exhiben un menor porcentaje de metoxilación, mientras que a mayores valores del pH disminuyen los rendimientos pero se gana en el grado de metoxilación de la cadena péctica (Sotelo *et al.*, 2016 y Meza *et al.*, 2017).

Por otra parte, el porcentaje de ácido anhidro galacturónico en la pectina de *Citrus maxima* L mostró su mayor valor cuando se utilizó la variante II con diferencia significativa en relación con el porcentaje observado al emplear la variante I (tabla 1). Este

comportamiento también coincide con el observado por otros autores para este importante parámetro al estudiar otras fuentes de pectinas (Orozco y Suárez, 2014).

La influencia del procedimiento de extracción utilizado sobre el rendimiento, el porcentaje de metoxilos y el porcentaje de ácido anhidro galacturónico (AAG) de la pectina extraída a partir de la especie *Citrus limon* L. mostró un comportamiento similar al observado en la especie *Citrus maxima* L y coincide, por lo tanto, con los antecedentes sentados por otros autores, tal y como se explicó anteriormente (tabla 2).

Procedimiento de Extracción	Rendimiento (%)	Metoxilos (%)	AAG (%)
Variante I	9.80a	8.19b	71.45b
Variante II	6.23b	10.17a	85.60a
Es x	± 0.22	± 0.29	± 0.31

Tabla 2. Influencia del procedimiento de extracción sobre el rendimiento, el porcentaje de metoxilos y el porcentaje de ácido anhidro galacturónico (AAG) de la pectina extraída de *Citrus limon* L.

*Valores con letras diferentes difieren significativamente según Duncan para $p < 0.05$

Los porcentajes de metoxilos y de ácido anhidro galacturónico constituyen indicadores de vital importancia a los efectos de la calidad de las pectinas. Del grado de metoxilación dependen la capacidad de gelificación, el tipo de gel formado y otras propiedades de la pectina en cuestión (Pérez, 2013), en tanto que el porcentaje de ácido anhidro galacturónico es el principal indicador de la pureza de una pectina cualquiera sea su origen. Una pectina se considera de alto metoxilo si el grado de metoxilación de la cadena poligalacturónica es superior al 7% y de alta pureza si el porcentaje de ácido anhidro galacturónico es superior al 70% (Baltazar et al., 2013).

Este es, precisamente, el rango de valores que se exige para las pectinas destinadas fundamentalmente a la industria de cosméticos, a la industria médico – farmacéutica y más recientemente a la investigación y desarrollo de productos bioactivos para uso agrícola.

Tanto las pectinas extraídas de *Citrus maxima* L como las que se obtuvieron a partir de *Citrus limon* L presentaron valores de los porcentajes de metoxilos superiores al 7% y de los porcentajes de ácido anhidro galacturónico superiores al 70%, respectivamente, aún cuando se utilizó la variante de extracción que emplea el extrayente de menor pH, lo que permite clasificarlas como pectinas de alto metoxilo y elevada pureza. De esta manera, ambas especies se perfilan como fuentes de pectinas promisorias para el desarrollo de nuevos bioproductos de naturaleza oligogalacturónica, los cuales suelen presentar actividad como estimuladores del crecimiento e inductores de resistencia sistémica adquirida en los cultivos.

Conclusiones.

Las pectinas extraídas de *Citrus maxima* L y de *Citrus limon* L poseen alto grado de metoxilación y un alto porcentaje de ácido anhidro galacturónico, por lo que ambas especies se perfilan como fuentes de pectinas promisorias para el desarrollo de nuevos productos bioactivos.

Referencias bibliográficas.

Baltazar, R., Carbajal, D., Baca, N. & Salvador, D. (2013). Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Agroindustrial Science*, 2, 255-262.

- Barreto, G. E., Púa, A. L., De Alba, D. D. & Pión, M. M. (2017). Extracción y caracterización de pectina de mango de azúcar (*Mangifera indica* L.). *Revista Temas Agrarios*, 22, 65-75.
- Casas, D. *et al.* (2015). Process development and simulation of pectin extraction from orange peels. *Food Bioprod. Process*, 96, 86-98.
- Costales, D. & Núñez, M. (2004). El uso de productos bioactivos en el crecimiento de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). En: XIV Congreso Científico del INCA. (Nov. 9-12, La Habana). Memorias. CD-ROM. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- Chaparro, S., Márquez, R., Sánchez, J., Vargas, M. & Gil, J. (2015). Extracción de pectina de fruto del higo (*Opuntia Ficus Indica*) y su aplicación en un dulce de piña. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica*, 18, 435-443.
- Falcón, A. & Cabrera, J. C. (2002). Actividad auxínica del Pectimorf como inductor del enraizamiento en pecíolos de violeta africana. En: I Taller Internacional de Oligosacarinas. II Taller de Productos Bioactivos. En: Memorias del XIII Congreso Científico del INCA. (Nov. 12-15, La Habana). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- Meza, T., Váquiro, H. A., Castillo, R. I., Paniagua, I., Ozuna, C. & Corona, E. (2017). Obtención de pectina de guayaba (*Psidium guajava* L.var. media china) mediante hidrólisis ácida asistida con ultrasonido de alta intensidad. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 575-581.
- Montaña, K. (2016). Obtención de pectina a partir de badea (*pasiflora quadrangularis*). Tesis para optar al título de Maestro en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
- Orozco, D. & Suárez, D. (2014). Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), subproducto de una industria chocolatera nacional. Tesis para optar al título de Químico industrial, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Pérez, C. (2013). High methoxyl pectin-methylcellulose films with antioxidant activity at a functional food interface. *J Food Eng*, 116, 162-169.
- Sotelo, L. E., Arrázola, G., Emeri, S. & Alvis, A. (2016). Extracción y caracterización de pectinas a partir del fruto de Limón Swinglea (*Swinglea glutinosa*). *Sennova*, 2, 47-58.

Fecha de recibido: 22 jun. 2018
Fecha de aprobado: 6 sept. 2018