



Universitat
de les Illes Balears

CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS DE LOS SUBPRODUCTOS DE NARANJA MEDIANTE ASISTENCIA ACÚSTICA

MÓNICA MARÍA UMAÑA ZAMORA

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química,
(Especialidad/Itinerario de Química y Tecnologías Alimentarias)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2015/2016

Fecha: Septiembre 2016

Firma del autor

Nombre Tutor del Trabajo: Valeria Soledad Eim Iznardo

Firma del tutor

Nombre Cotutor: María Carmen Rosselló Matas

Firma del cotutor

Valeria Soledad Eim Iznardo, Profesora ayudante doctora de Ingeniería Química de la Universitat de les Illes Balears.

Carmen Rosselló Matas, Catedrática de Ingeniería Química de la Universitat de les Illes Balears.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado " CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS DE LOS SUBPRODUCTOS DE NARANJA MEDIANTE ASISTENCIA ACÚSTICA " ha sido realizado bajo nuestra dirección por la alumna Mónica María Umaña Zamora y constituye la Memoria de su proyecto del Máster en Ciencia y Tecnología Química en el módulo de Químicas y Tecnologías alimentarias, cuya presentación se autoriza.

Palma de Mallorca, Septiembre de 2016



Valeria Eim Iznardo



Carmen Rosselló Matas

GRACIAS, primeramente a Dios por poner esta oportunidad en mi camino y darme la fortaleza necesaria para afrontarla.

A mi mamá, por enseñarme a trabajar por lo que quiero y porque en la distancia nunca dejé de sentir su cariño. A mi papá que desde pequeña me levantó para alcanzar mis metas y creyó en mí desde el principio; siendo siempre un ejemplo de tenacidad y perseverancia. A ellos está dedicado este trabajo.

A Gaby por inspirarme siempre con su templanza y madurez y a Regi quien a pesar de ser la pequeña, me enseñó a afrontar los retos con coraje. Los amo.

A Gus, quien aunque estuvo a 8000 km de distancia, nunca ha estado lejos, sin vos no hubiera podido.

A la Fundación Carolina por elegirme y por hacer posible este sueño.

A las doctoras Valeria Eim y Carmen Rosselló, que dirigieron este trabajo y me orientaron con especial dedicación y paciencia. Y sobre todo porque me brindaron su amistad y me hicieron sentir parte de una familia. A la doctora Susana Simal y al doctor Antoni Femenia por compartir sus conocimientos conmigo.

A todos mis compañeros del Grupo de Ingeniería Agroalimentaria de la Universidad de les Illes Balears por su amistad y por todos los momentos que recordaré siempre con cariño. Especialmente a Espe por guiarme y enseñarme con paciencia y calmarme en cada una de mis crisis.

A todos los profesores cuyas clases enriquecieron mis conocimientos y a todos los nuevos amigos, que me escucharon y me ayudaron; especialmente a Pau, mi compañera de aventuras. GRACIAS.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA.....	3
1.1.1. Subproductos del procesado de naranja	3
1.1.2. Compuestos bioactivos de los subproductos de naranja.....	3
1.2. PECTINAS.....	4
1.2.1. Pared celular vegetal.....	4
1.2.2. Estructura de las pectinas	6
1.2.3. Calidad de las pectinas	7
1.2.4. Aplicaciones tecnológicas de las pectinas.....	8
1.3. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO.....	8
1.3.1. Procesos de extracción de pectinas	8
1.3.2. Intensificación de procesos de extracción sólido-líquido mediante aplicación de ultrasonidos.....	9
1.3.3. Modelización y simulación de los procesos de extracción sólido-líquido... ..	12
1.3.4. Modelo de Weibull.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. MATERIA PRIMA.....	15
3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	15
3.2.1. Acondicionamiento de los subproductos de la naranja.....	15
3.2.2. Determinación de la capacidad calorífica del solvente de extracción	16
3.2.3. Determinación de la potencia de los equipos de ultrasonidos. Estudio calorimétrico	17
3.3. EQUIPOS DE EXTRACCIÓN.....	17
3.3.1. Equipo extractor I: agitación mecánica	17
3.3.2. Equipo extractor II: ultrasonidos de potencia	18
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
3.4.1. Proceso de extracción	20

3.5.	ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	21
3.5.1.	Contenido de humedad.....	21
3.5.2.	Determinación de color.....	21
3.5.3.	Microestructura: microscopía electrónica de barrido (SEM)	21
3.5.4.	Extracción de la fibra alimentaria. Residuo insoluble en alcohol (AIR).....	21
3.5.5.	Identificación y cuantificación de azúcares.....	22
3.5.6.	Determinación del grado de metilesterificación (GME) de las pectinas.....	24
3.6.	MODELIZACIÓN	25
3.7.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1.	CAPACIDAD CALORÍFICA DEL SOLVENTE DE EXTRACCIÓN	26
4.2.	CARACTERIZACIÓN DE LAS SONDAS DE ULTRASONIDOS.....	26
4.3.	CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO DE PIEL DE NARANJA	26
4.4.	INTENSIFICACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN MEDIANTE APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS.....	28
4.4.1.	Cinéticas de extracción.....	28
4.4.2.	Modelización de las cinéticas de extracción	30
4.5.	EFFECTOS DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN EN LA COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS	33
4.5.1.	Determinación del color.....	33
4.5.2.	Microscopía electrónica de barrido	34
4.5.3.	Composición de monosacáridos de los extractos	35
4.5.4.	Composición de polisacáridos de los extractos.....	38
4.5.5.	Estructura de las pectinas extraídas.....	39
4.5.6.	Grado de metilesterificación (GME).....	41
5.	CONCLUSIONES	43
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	45
7.	ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Representación esquemática de la estructura de la celulosa	5
Figura 1.2: Representación de los principales tipos de hemicelulosa	5
Figura 1.3: Cadena de ácido D-galacturónico con grupos metilesterificados.	6
Figura 1.4: Representación esquemática de la estructura de la pectina.....	7
Figura 1.5: Equipos de aplicación de los ultrasonidos	11
Figura 3.1: Subproductos de la naranja	15
Figura 3.2: Procedimiento de obtención del concentrado de piel de naranja.	16
Figura 3.3: Concentrado de piel de naranja (CPN).....	16
Figura 3.4: Equipo de extracción con agitación mecánica.....	18
Figura 3.5: Equipo de extracción con ultrasonidos de potencia.....	18
Figura 3.6: Procesador y sondas de ultrasonidos de potencia.	18
Figura 3.7: Esquema del diseño experimental de la investigación.....	19
Figura 3.8: Experimentos de extracción de pectinas	20
Figura 3.9: Linealidad, cantidad de cadenas y longitud de cadenas laterales de las pectinas ...	24
Figura 4.1: Simulación de las cinéticas de extracción a pH 1.5.....	32
Figura 4.2: Simulación de las cinéticas de extracción a pH 2.0.....	32
Figura 4.3: Fotografías de los extractos.....	33
Figura 4.4: Microfotografías de los extractos.....	35
Figura 4.5: Composición en celulosa, hemicelulosa y pectinas de los extractos.....	38
Figura 4.6: GME de las pectinas extraídas.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Revisión bibliográfica. Uso del modelo de Weibull para modelizar la extracción de compuestos a partir de materia prima vegetal.....	13
Tabla 4.1: Densidad acústica de las sondas estudiadas.....	26
Tabla 4.2: Características físico químicas del concentrado de piel de naranja.	27
Tabla 4.3: Composición de azúcares del concentrado de piel de naranja (CPN).....	28
Tabla 4.4: Nomenclatura de los experimentos de extracción	28
Tabla 4.5: Rendimientos del proceso de extracción (g de extracto/100 g CPN b.s.).....	29
Tabla 4.6: Parámetros identificados del modelo de Weibull.....	30
Tabla 4.7: Ecuaciones propuestas para Y_{max} en función de la potencia acústica	30
Tabla 4.8: Error relativo medio (ERM) y varianza explicada (VAR) en la comparación entre los valores experimentales y simulados	32
Tabla 4.9: Parámetros de color medidos para los extractos	34
Tabla 4.10: Composición de monosacáridos de los extractos (expresadas en %molar)	36
Tabla 4.11: Revisión bibliográfica. Composición de monosacáridos de pectinas extraídas a partir de cítricos	37
Tabla 4.12: Estructura de las pectinas extraídas	40

RESUMEN

Una de las principales materias primas vegetales procesadas y que contribuyen en mayor medida a la generación de subproductos son los cítricos, especialmente las naranjas. Se estima que la producción mundial de naranjas en el 2013 fue de 71,445,352 t; de las cuales aproximadamente el 70% se destinó a la manufactura de productos tales como zumos y mermeladas. Los subproductos resultantes del procesado de los cítricos representan cerca del 50% del peso de los mismos.

Los subproductos generados en la producción de zumos constituyen potenciales fuentes de compuestos bioactivos. Destacan por su alto valor comercial los aceites esenciales, compuestos fenólicos y polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina). En cuanto a las pectinas, sus principales aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética se deben a sus propiedades gelificantes y estabilizantes. Los métodos convencionales de extracción de pectinas emplean ácidos minerales (HCl, HNO₃, H₂SO₄) y elevadas temperaturas (entre 60 y 100°C); el proceso es lento (0.5 hasta 7 h) y las pectinas pueden sufrir degradaciones en estas condiciones.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la aplicación de asistencia acústica como tecnología para favorecer la extracción de pectinas de subproductos de naranja (var. *Navelina*), utilizando un ácido orgánico (ácido cítrico) como disolvente, potenciando así su posible uso alimentario. Para alcanzar el objetivo planteado se procedió a estudiar el efecto de la potencia acústica y el pH del medio sobre las cinéticas de extracción, el grado de metilesterificación, el color y la composición de los extractos obtenidos.

Para evaluar el efecto de la asistencia acústica, se utilizaron dos potencias de ultrasonidos (US) (US1=542±4 y US2=794±4 W L⁻¹), usando como control el tratamiento sin asistencia acústica con agitación a 82 rpm. Como medio de extracción se utilizó ácido cítrico a dos pH (1.5 y 2.0); y se obtuvieron las cinéticas a diferentes tiempos de extracción (0, 3, 6, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min); todas las experiencias se realizaron a temperatura controlada de 25±2°C; las cinéticas se modelizaron mediante el modelo empírico de Weibull. Se caracterizaron los extractos obtenidos mediante la determinación de color, microestructura, composición en monosacárido y polisacáridos y grado de metilesterificación (GME).

Los resultados obtenidos indicaron que la asistencia acústica aumenta significativamente el rendimiento de extracción en ambos pH estudiados, sin embargo dicho aumento es más evidente a pH de 1.5. El modelo de Weibull permitió realizar la predicción con una elevada precisión de las curvas de extracción (los valores medios del porcentaje de varianza explicada fueron mayores del 91.9%, y los errores relativos medios menores del 7.2%), tanto para los procesos de extracción control como para las extracciones con asistencia acústica. La identificación paramétrica mediante este modelo, demostró que los rendimientos máximos de extracción aumentaron de forma lineal en función de la potencia acústica y que además se obtuvieron cinéticas de extracción más rápidas con la aplicación de US.

Los extractos obtenidos mediante asistencia acústica presentaron una ligera decoloración y pérdida de luminosidad con respecto a los obtenidos mediante condiciones control; sin embargo, al calcular la diferencia total de color de todos los extractos obtenidos con respecto al color blanco, no se observaron diferencias significativas entre los extractos obtenidos en las diferentes condiciones estudiadas. En cuanto a la microestructura, se pudo observar diferencias

entre los extractos obtenidos mediante asistencia acústica y los obtenidos en las condiciones control; ya que los primeros presentaron una estructura visiblemente más plana y lisa.

La evaluación de la composición en monosacáridos de los extractos demostró una disminución significativa en el contenido de azúcares pécticos con la aplicación de US cuando el tiempo de extracción fue de 60 min para ambos pH estudiados, lo que se traduce en un aumento significativo en el contenido de azúcares no pécticos en aquellos extractos obtenidos mediante asistencia acústica, sin embargo no se observaron cambios significativos en el contenido de azúcares pécticos con la aplicación de US cuando el tiempo de extracción fue de 30 min para ninguno de los pH. La estructura de las pectinas se vio afectada por una disminución de la linealidad de las mismas cuando se extrajeron mediante asistencia acústica a pH 2.0 durante 60 min, con respecto a las condiciones control.

En cuanto al grado de metilesterificación, se pudo concluir que éste no se vio afectado por la asistencia acústica, pero sí por el pH de extracción, obteniéndose pectinas con mayor grado de metilesterificación a pH 1.5. A dicho pH no se observaron diferencias significativas entre las pectinas extraídas a 30 y a 60 min; sin embargo a pH 2.0, las pectinas extraídas a 60 min presentaron un GME significativamente superior.

En definitiva, los resultados experimentales obtenidos indicaron que la extracción mediante asistencia acústica permitió la obtención de rendimientos más altos que en las condiciones control, especialmente en el pH más bajo (pH 1.5); sin afectar la calidad de las pectinas con respecto al contenido de azúcares pécticos, estructura y GME, en tiempos de extracción de 30 min, siendo este último parámetro (GME) afectado principalmente por el pH de extracción de tal manera que se obtuvieron pectinas con mayor GME con el pH de extracción más bajo (pH 1.5).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

Un elevado porcentaje de la actividad industrial mundial se desarrolla en el área agroindustrial y en la última década ha experimentado un importante crecimiento, llegando a un volumen de negocio en 2013 de \$121.9 millones (FAOSTAT, 2016). En las últimas décadas, ha surgido una creciente preocupación por revalorizar los residuos generados por la actividad de la industria alimentaria tanto por razones económicas como medioambientales (González-Centeno et al., 2010).

La Directiva Europea (Dir. 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de abril de 2006) establece que: “es importante favorecer la valorización de los residuos y la utilización de materiales valorizados a fin de preservar los recursos naturales. Su desarrollo busca contribuir a la transformación de los países miembros de la UE en una “sociedad del reciclado”, que trate de evitar la generación de residuos y que utilice los residuos como un recurso”. Según la ley 22/2011 modificada por la ley 5/2013 se denomina “residuo” a cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseche o tenga la intención o la obligación de desechar; y “subproducto” a una sustancia resultante de un proceso de producción cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia, pero que tenga un valor comercial. Por ello, la tendencia actual en la industria es la de conseguir transformar lo que es un residuo en un subproducto.

1.1.1. Subproductos del procesado de naranja

Desde el punto de vista de su comercialización, las naranjas son el cítrico más importante. Según la base estadística de la Organización de la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, 2016), la producción mundial de naranjas en el 2013 fue de 71,445,352 t; de las cuales aproximadamente el 70% se destinó a la manufactura de productos tales como zumos y mermeladas.

Los subproductos resultantes del procesado de los cítricos representan cerca del 50% del peso de los mismos y están compuestos principalmente por la piel, la pulpa y las semillas (Boukroufa et al., 2015). Debido a la gran demanda química y biológica de oxígeno, el almacenamiento, transformación y/o eliminación de tal cantidad de subproductos/residuos constituye un serio problema en términos ecológicos y económicos (Siles et al., 2016).

Durante décadas los residuos de las industrias elaboradoras de zumos han sido utilizados como alimento animal o como abono orgánico para suelos (Garau et al., 2007). Recientemente se ha demostrado el efecto fitotóxico y antimicrobiano de algunos polifenoles durante el proceso de compostaje, ocasionando la inhibición de la germinación (Heerden et al., 2002; Bustamante et al., 2010). Así pues, de forma previa a su uso como fertilizante ya que los residuos de cítricos contienen compuestos fenólicos (M'hiri et al., 2015), es necesario realizar un pre-tratamiento de los residuos con el correspondiente coste que ello supone.

1.1.2. Compuestos bioactivos de los subproductos de naranja

Los subproductos del procesado de la naranja constituyen una fuente de diversos nutrientes y compuestos de alto valor comercial. La piel y las semillas de la naranja, son ricos en compuestos fenólicos; según la variedad, su contenido varía entre 0.67 a 19.62 g/100 g de

materia b.s. (base seca) (M'hiri et al., 2015). De dichos subproductos se obtienen también aceites esenciales, principalmente compuestos por limoneno, linalol, α -pineno, β -pineno y n-octanal, que se utilizan como aromatizantes y saborizantes; así como también pigmentos carotenoides que tienen un importante efecto beneficioso en la salud, por ser precursores de la vitamina A y también por su capacidad antioxidante (Mira et al., 1999).

Otro grupo de biocompuestos de interés lo constituyen los polisacáridos, principalmente las pectinas. Müller-Maatsch et al. (2016) seleccionaron para su estudio 26 subproductos procedentes de la industria alimentaria evaluando su uso potencial como fuente de polisacáridos pécticos y determinaron que los mayores rendimientos se obtienen de subproductos de naranja (247 mg/g b.s.).

1.2. PECTINAS

Las pectinas constituyen el grupo de polisacáridos más complejo de la pared celular y se encuentran clasificadas dentro del término fibra dietética (DF).

Según la Comisión de Codex Alimentarius (2009), la fibra dietética incluye los carbohidratos poliméricos con al menos 10 unidades monoméricas, que no son hidrolizados en el intestino delgado humano. Los carbohidratos poliméricos pueden ser de origen natural; se pueden obtener por medios físicos, enzimáticos o químicos; o pueden ser sintéticos. Independientemente de su procedencia deben presentar efectos fisiológicos beneficiosos para la salud demostrables científicamente (Rainakari et al., 2016). En la Unión Europea los oligosacáridos con 3-9 unidades monoméricas también se incluyen como DF (EFSA, 2010).

La fuente principal natural de fibra dietética, y por lo tanto de pectinas son las paredes celulares de los vegetales.

1.2.1. Pared celular vegetal

La pared celular es única en cada planta, y es muy importante para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de la misma en diferentes entornos. Es una mezcla compleja de polisacáridos, cuya composición varía considerablemente en función de la planta y el tipo de tejido (Zhang et al., 2016). Sin embargo, todas las paredes celulares de las plantas tienen una estructura básica similar. Los polisacáridos que forman las paredes celulares se clasifican en tres tipos: celulosa, hemicelulosa y pectinas (Caffall & Mohnen, 2009).

- **Celulosa**

La celulosa es un homopolímero de la pared celular que resulta de la unión lineal de monómeros de glucosa, mediante enlaces glucosídicos tipo β -1,4, formando cadenas de más de 15,000 unidades. Este polisacárido se organiza en microfibrillas unidas mediante puentes de hidrógeno, que a su vez interaccionan entre sí formando macrofibras de celulosa, visibles mediante microscopía electrónica (Figura 1.1). La celulosa se caracteriza por ser insoluble en agua, como consecuencia de los puentes de hidrógeno tanto intra como intermoleculares, establecidos entre el oxígeno del anillo de un residuo de glucosa y el hidrógeno del grupo hidroxilo del C₃ de otro residuo vecino (Brett & Waldron, 1990).

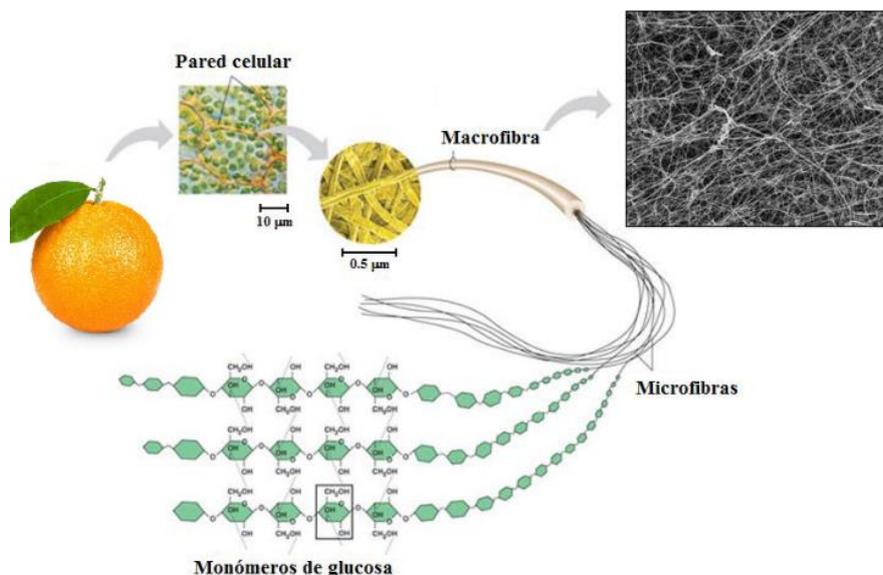


Figura 1.1: Representación esquemática de la estructura de la celulosa (González-Centeno, 2013)

- **Hemicelulosas**

Las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos con cadenas ramificadas. La composición de las hemicelulosas depende de la planta y del tipo de tejido (Gropper, 2012). A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas están constituidas por más de un tipo de monosacárido, lo que da lugar a diferentes heteropolímeros. De entre ellos, los xiloglucanos, destacan por su presencia mayoritaria en frutas y hortalizas, están formados por una cadena principal de glucosa con ramificaciones α -1,6 de xilosa, que a su vez pueden presentar sustituciones β -1,2 con unidades de galactosa, fucosa y/o arabinosa (Buckeridge, 2010). Un segundo tipo de polisacáridos perteneciente al grupo de hemicelulosas es el de los xilanos ácidos o glucuronoxilanos. También destacan los glucomananos y los arabinoxilanos. En la Figura 1.2 se observa una representación esquemática de las principales hemicelulosas (González-Centeno, 2013).

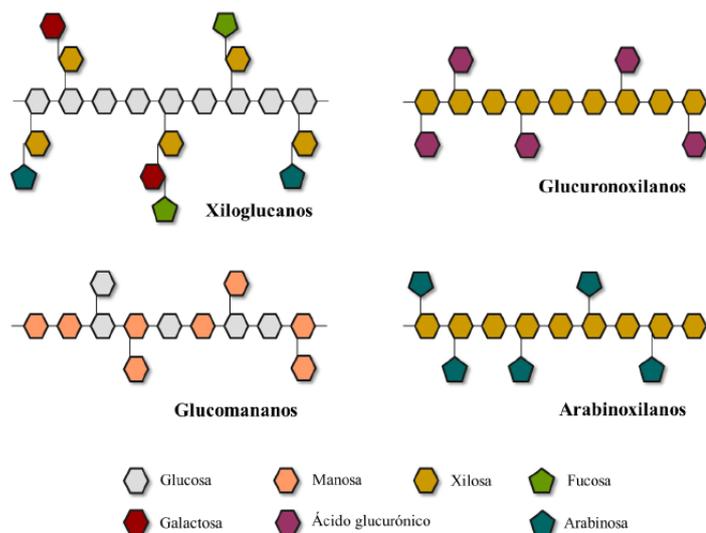


Figura 1.2: Representación de los principales tipos de hemicelulosa (González-Centeno, 2013)

1.2.2. Estructura de las pectinas

Las pectinas constituyen el grupo de polisacáridos más complejo de la pared celular. La mayor parte de la estructura de la pectina contiene una cadena principal de monómeros de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1,4 que están parcialmente metilesterificados o acetilados (Hosseini et al., 2016) (Ver Figura 1.3). El grado de metilesterificación (GME, porcentaje de grupos carboxilos esterificados con metanol) es un parámetro importante para la clasificación y aplicación de las pectinas. Según el GME, las pectinas se dividen en dos grupos: pectinas de alto metoxilo (HMP) con GME mayor al 50% y de bajo metoxilo (LMP) con GME menor al 50% (Hosseini et al., 2016).

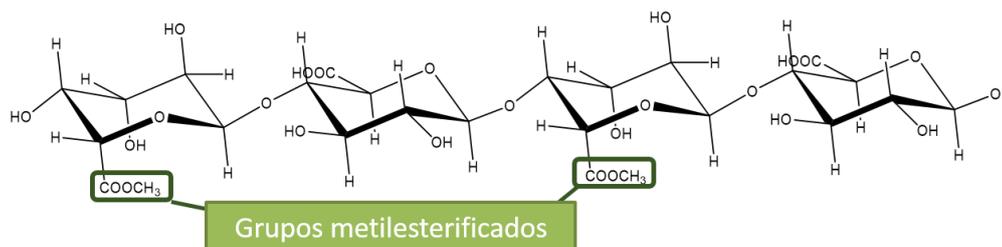


Figura 1.3: Cadena de ácido D-galacturónico con grupos metilesterificados.

Las pectinas están formadas principalmente por dos grandes tipos de polisacáridos, que contienen ácido galacturónico (GalA) en mayor o menor grado: Homogalacturano (HG) y ramnogalacturonanos I (RGI), y en menor medida también por ramnogalacturonanos II (RGII) (Willats et al., 2006). Los HG se caracterizan por tener una cadena principal formada por unidades de ácido galacturónico, que ocasionalmente y en muy pequeña proporción pueden presentar enlaces α -1,2 con unidades de L-ramnosa.

Por su parte, los RGI se caracterizan por la presencia de unidades de ramnosa intercaladas en la cadena principal de ácido galacturónico (enlaces α -1,2). Las cadenas laterales, unidas a la posición C₄ de la ramnosa, están principalmente constituidas por arabinosa y galactosa (Arnous & Meyer, 2009).

Y por último, los RGII son moléculas complejas de bajo peso molecular cuya cadena principal está compuesta por homogalacturanos a los cuales se encuentran unidos cuatro cadenas laterales altamente conservadas que consisten en doce monosacáridos diferentes incluyendo GalA y azúcares poco usuales, este tipo de cadenas es muy poco común en comparación a RGI (Yapo et al., 2007a). En la Figura 1.4 se puede observar una representación esquemática de la estructura antes descrita.

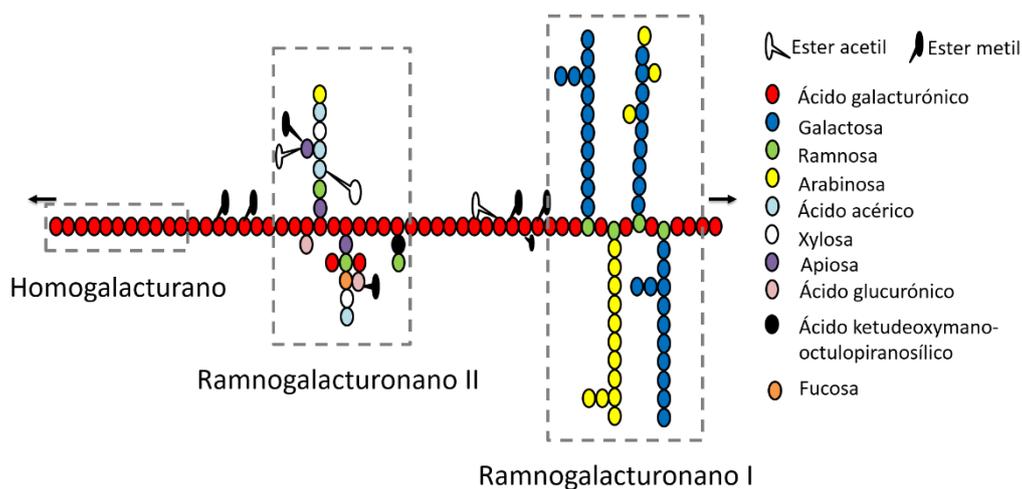


Figura 1.4: Representación esquemática de la estructura de la pectina (Willats et al., 2006)

1.2.3. Calidad de las pectinas

Actualmente no existe una definición consensuada para el término “calidad de las pectinas”. Sin embargo, en la mayoría de investigaciones se relaciona el término calidad con aquellas características físico-químicas que le confieren a la molécula la propiedad de formar geles lo que le permite tener una serie de aplicaciones tecnológicas (Kratchanova et al., 1994; Yapó et al., 2009a; Bagherian et al., 2011; Zanella & Taranto, 2015).

Las pectinas forman geles si las porciones de la cadena de homogalacturano (HG) se enlazan para formar una red cristalina tridimensional en la que el agua y los sólidos quedan atrapados (Willats et al., 2006). Los factores que más afectan a las propiedades gelificantes son el grado de metilesterificación y la longitud de la cadena de HG (Ibarz et al., 1999).

En numerosos estudios se ha evaluado la calidad de las pectinas en base al grado de metilesterificación y el contenido de ácido galacturónico (Kratchanova et al., 1994; Yapó et al., 2009a; Bagherian et al., 2011; Zanella & Taranto, 2015), incluso la FAO establece que, entre sus características, las pectinas deberán tener al menos un 65% de ácido galacturónico para considerarse como un aditivo de calidad (FAO, 2009).

El GME es un indicador de las condiciones de gelificación: en las pectinas HMP las zonas de unión se forman por la reticulación de HG por puentes de hidrógeno y fuerzas hidrófobas entre grupos metoxilo; esta reticulación es promovida por la alta concentración de azúcar (55% o más) y pH bajos (2.0-2.4). En las pectinas LMP, las zonas de unión se forman por los enlaces entre el calcio y los grupos carboxilo, en amplios rangos de pH (2.0 a 6.0) (Willats et al., 2006; Hosseini et al., 2016). Otras características que también se han tomado como parámetros de calidad son el peso molecular, el grado de gelificación y la viscosidad intrínseca (Crandall et al., 1978; Yapó et al., 2009b; Kulkarniet et al., 2010). Recientemente, también se ha estudiado la composición de monosacáridos de las pectinas, ya que proporciona información de las cadenas que forman la molécula, y además permite conocer la proporción de ácido galacturónico con respecto a otros azúcares e identificar la presencia de azúcares pertenecientes a otros polisacáridos no pécticos (Wang et al., 2015; Müller-Maatsch et al., 2016).

1.2.4. Aplicaciones tecnológicas de las pectinas

Las pectinas tienen múltiples aplicaciones en la industria y su consumo anual mundial se estima en alrededor de 45 millones de kg, con un valor de mercado global de al menos 400 millones de euros (Willats et al., 2006).

Las pectinas se utilizan ampliamente como adyuvante tecnológico en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Las propiedades tecnológicas de las pectinas dependen de su estructura, y dependiendo de su composición tendrán propiedades gelificantes, emulsionantes y/o estabilizantes (de Oliveira et al., 2015). Específicamente, en la industria alimentaria, las pectinas se utilizan como agente gelificante para la producción de jaleas y mermeladas (pectinas HMP) (Naeem et al., 2015), como estabilizante de bebidas (Mirhosseini et al., 2008), y como espesante en productos lácteos (pectinas LMP, ya que estos alimentos contienen calcio) (Arltoft et al., 2008).

Además de sus propiedades tecnológicas, las pectinas presentan efectos beneficiosos para la salud. Destacan por su actividad antiinflamatoria (pectinas HMP) (Tummalapalli et al., 2016), disminución de la absorción lipídica (Espinal-Ruiz et al., 2016); efecto hipercolesterolémico (Zhu et al., 2015) e hipoglucémico (Liu et al., 2016). Asimismo se ha comprobado que las pectinas extraídas de naranjas, manzanas y ginseng reducen la proliferación celular, la migración y la adhesión, e inducen la apoptosis en células de cáncer de colon (Maxwell et al., 2016).

Debido a que las pectinas pueden ser fermentadas por bacterias en el colon, produciendo ácidos grasos de cadena corta; se está valorando su uso potencial como prebiótico (Manderson et al., 2015).

1.3. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

La extracción sólido-líquido es una de las operaciones unitarias más ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y, entre otros fines, se aplica en la recuperación de ciertos compuestos bioactivos retenidos en la matriz de productos naturales (Pinelo et al., 2006).

La extracción sólido-líquido (S-L) es un proceso de transferencia de materia mediante el cual el compuesto de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Dicho mecanismo tiene lugar en dos etapas: una primera en la que se produce una rápida transferencia del soluto desde la superficie del sólido al disolvente; y una segunda etapa de transferencia desde el interior del sólido mediante difusión (Sturzoiu & Stroescu, 2011). En la mayoría de sistemas de extracción de la industria alimentaria, se asume que la segunda etapa es el paso limitante del proceso, debido a la resistencia natural que ofrece la fase sólida (a menudo tejidos de origen vegetal) a la transferencia de materia y/o penetración de líquidos (Hojnik et al., 2008).

Las materias primas vegetales contienen en general, pequeñas concentraciones de soluto activo, pero de alto valor añadido que justifica el desarrollo de procesos de separación de alto rendimiento (Romdhane, 2002).

1.3.1. Procesos de extracción de pectinas

El proceso de extracción de pectinas se ve afectado por diferentes variables de operación: la temperatura de extracción, el pH del medio, el ratio solvente/materia prima y el tiempo de

contacto (Levigne et al., 2002; Masmoudi et al., 2012; Kaya et al., 2014; Maran & Priya, 2015; Wang et al., 2016a).

Comercialmente, la pectina se extrae principalmente a partir de los subproductos obtenidos de manzana y cítricos como las naranjas y los limones (May, 1990). Los métodos tradicionales de obtención de pectinas emplean como solventes de extracción ácidos minerales, tales como HCl, HNO₃ o H₂SO₄, a pH entre 1.5 a 3.0; temperaturas elevadas comprendidas entre 60 y 100°C, y tiempos que van desde 0.5 hasta 7 h (Masmoudi et al., 2012; Kaya et al., 2014; de Oliveira et al., 2015; Wang et al., 2015).

El uso de ácidos minerales y sus efluentes, en la producción industrial de pectinas suponen un coste elevado para las empresas. Con la finalidad de reducir este problema se ha investigado la sustitución de dichos ácidos minerales por ácidos orgánicos como el ácido cítrico (Kurita et al., 2008; Yapo, 2009a; Seixas et al., 2014), obteniéndose rendimientos similares o incluso mayores que los obtenidos al emplear ácidos minerales (Zanella & Taranto, 2015).

El uso de ácidos orgánicos en lugar de ácidos minerales permite eliminar posibles elementos tóxicos de los extractos de pectinas, por lo que el producto final tendría la posibilidad de pertenecer a la lista denominada como GRAS (siglas en inglés para los productos “generalmente reconocidos como seguros”) y ser aceptados para el consumo humano (Min et al., 2011).

Por otro lado, el reciente desarrollo del concepto “química verde” como sinónimo de sostenibilidad ambiental, ha impulsado la investigación en la línea de la mejora de procesos tradicionales, entre ellos los de extracción para hacerlos más respetuosos con el medio ambiente (Boukroufa et al., 2015). Tecnologías tales como la extracción asistida por microondas (Zhongdong et al., 2006; Prakash et al., 2013; Seixas et al., 2014), el uso de campos eléctricos moderados (de Oliveira et al., 2015) y la extracción asistida acústicamente (Bagherian et al., 2011; Minjares-Fuentes et al., 2014; Xu et al., 2014; Wang et al., 2015; Grassino et al., 2016;) han sido propuestas como tecnologías emergentes capaces de dar lugar a rendimientos más altos en tiempos más cortos.

1.3.2. Intensificación de procesos de extracción sólido-líquido mediante aplicación de ultrasonidos

La intensificación de procesos es actualmente una de las áreas con mayor potencial de desarrollo en la industria alimentaria. Consiste en modificar procesos convencionales o desarrollar nuevas tecnologías para reducir las necesidades de energía, aumentar rendimientos y/o incrementar la calidad de productos con el consiguiente beneficio medioambiental.

Concretamente, se persigue a través de tecnologías más sostenibles incrementar el rendimiento productivo, la calidad y seguridad del procesado, así como reducir el tamaño de equipos (principal y auxiliar) de residuos y de necesidades energéticas (Benali & Kudra, 2010).

Entre las diferentes técnicas que se pueden utilizar para la intensificación de procesos (microondas, infrarrojos, pulsos eléctricos) cabe destacar la aplicación de energía acústica. Una de las principales características de los ultrasonidos de potencia es su capacidad para mejorar los procesos de transferencia de materia mediante una serie de mecanismos activados por los efectos no lineales de las ondas ultrasónicas de elevada amplitud; dichos mecanismos incluyen

formación de microcorrientes, difusión, agitación, implosiones, compresiones y dilataciones, turbulencia, inestabilidades en las interfases, etc. (Cárcel et al., 2011).

La energía acústica es uno de los tipos fundamentales de energía que pueden encontrarse en la naturaleza. Las ondas que la componen son oscilaciones mecánicas en el tiempo y en el espacio que, a diferencia de las ondas electromagnéticas, necesitan de un medio material para su propagación (González-Centeno, 2013).

Las ondas acústicas pueden clasificarse en función de su frecuencia denominándose ondas subsónicas aquellas que se encuentran por debajo de los 20 Hz; ondas sónicas, las que presentan frecuencias comprendidas entre 20 Hz y 20 kHz, rango que aproximadamente delimita el campo de audición humano; y ondas ultrasónicas o ultrasonidos, que son aquellas que superan los 20 kHz de frecuencia (Povey, 1998).

A su vez los ultrasonidos pueden clasificarse según sus aplicaciones industriales a partir de su frecuencia e intensidad. Por una parte, se distinguen los ultrasonidos de señal, de baja potencia o de baja intensidad. Éstos se caracterizan por presentar frecuencias comprendidas entre 500 kHz y 10 MHz, e intensidades inferiores a 1 W/cm^2 . Dado que la energía transmitida al medio por este tipo de ultrasonidos es débil, su aplicación no induce cambios en el sistema. De ahí, su uso en el control de procesos y en el análisis no invasivo de materiales. Ejemplos de ello serían la imagen médica, los sondeos submarinos o la monitorización de la composición y/o propiedades de los alimentos durante su procesado y/o almacenamiento. Estas aplicaciones diagnósticas se basan en el estudio de la variación de las propiedades de las ondas acústicas (velocidad, atenuación) a su paso por un medio físico concreto (González-Centeno, 2013)

Por otra parte, se definen los ultrasonidos de potencia (US), también conocidos como de alta intensidad, cuyas frecuencias oscilan entre los 20 y 100 kHz y su intensidad es superior a 1 W/cm^2 . Este tipo de ultrasonidos tiene la capacidad de producir cambios en las propiedades físicas, mecánicas, químicas y/o bioquímicas del material o proceso en el que se aplican, derivando de ello una amplia gama de aplicaciones industriales (Awad et al., 2012).

Los efectos de los ultrasonidos aplicados a medios líquidos, están asociados al fenómeno de cavitación, que consiste en la formación, crecimiento e implosión de nano/microburbujas de gas en el seno del líquido como consecuencia de las fluctuaciones de presión generadas por el paso de las ondas ultrasónicas (Virost et al., 2010; Shirsath et al., 2012). Cuando los ultrasonidos se propagan a través de un fluido, las moléculas oscilan alrededor de su posición de equilibrio, haciendo que las distancias intermoleculares se modifiquen continuamente siguiendo ciclos alternos de compresión y descompresión de manera similar a cuando se aplica presión a una esponja y se suelta en repetidas ocasiones (efecto esponja). Alcanzado un cierto umbral de intensidad ultrasónica, la disminución de presión durante el ciclo de descompresión puede vencer las fuerzas de atracción entre moléculas vecinas, pudiendo aparecer cavidades en el seno del líquido a partir de núcleos de gas pre-existentes (Esclapez et al., 2011).

Si el flujo de gas del sistema burbuja-líquido es similar en ambas direcciones, las oscilaciones de tamaño son regulares, apareciendo la denominada cavitación estable. Pero si no lo es, se puede dar una cavitación transitoria, en esta cavitación la burbuja crece progresivamente en cada ciclo hasta implosionar, generando un estado de elevada energía. En dicho estado, cuando el sistema es sólido-líquido, pueden producirse las llamadas microinyecciones que alteran de

forma significativa las características y estructura del sólido, pues pueden provocar el descamado y erosión de su superficie, así como la formación de microfracturas, incrementando la transferencia de materia entre las dos fases (Vilkhu et al., 2008; Ye et al., 2011).

Entre las formas de aplicación de ultrasonidos en medios líquidos destacan los baños y los sistemas tipo sonda, los primeros presentan ciertas desventajas tales como la poca potencia y el difícil control de la temperatura (Figura 1.5) (González-Centeno, 2013).

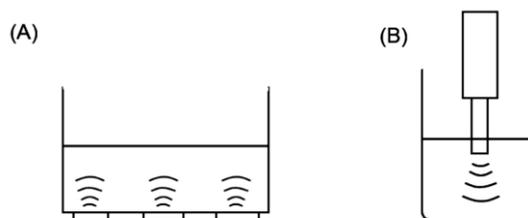


Figura 1.5: Equipos de aplicación de los ultrasonidos. A: baño. B: sonda de inmersión ultrasónica (Vinatoru et al., 1997).

- **Uso de ultrasonidos de potencia en la extracción de biocompuestos**

Los ultrasonidos de potencia se caracterizan por una amplia y potencial aplicabilidad en la industria alimentaria. De entre sus principales aplicaciones destaca su uso en procesos industriales de extracción, emulsificación, cristalización, esterilización, secado, tenderización y marinado de carne (Alarcon-Rojo et al., 2015; Mason et al., 2015).

En el área de la extracción de compuestos bioactivos, destaca la actividad de la empresa italiana Giotti que durante más de 20 años ha utilizado procesos asistidos acústicamente para la producción de bebidas alcohólicas, alimentos y aditivos nutraceuticos; afirmando que la extracción asistida acústicamente es rápida, limpia y eficiente (Mason et al., 2015).

Según Mason (2011) los ultrasonidos de potencia incrementan la eficacia del proceso de extracción mediante cuatro mecanismos interconectados :

- Rotura de las paredes celulares: como consecuencia de la formación de microinyecciones por la implosión de las burbujas de cavitación, aumentando la permeabilidad del tejido vegetal. Este efecto también reduce el tamaño de partícula y aumenta la superficie sólida en contacto con el disolvente de extracción.
- Incremento de la solubilidad de los analitos: provocada por un incremento de la temperatura por la energía liberada en la implosión.
- Mejora de la penetración del disolvente en la matriz del soluto: como consecuencia del aumento localizado de presión que genera poros en la pared celular, promoviendo la introducción del solvente en la célula.
- Mejora de la transferencia de materia: debido a que los ultrasonidos provocan microcorrientes que favorecen la continua renovación de la capa límite en contacto con la superficie sólida.

Recientemente, se han llevado a cabo diversos estudios sobre la extracción acústica de biocompuestos en tejidos vegetales, entre los cuales se pueden mencionar: lípidos (Sicaire et al., 2016; Meullemiestre et al., 2016); polisacáridos (Minjares-Fuentes et al., 2014; Zhang et al.,

2016) y, compuestos antioxidantes, fenólicos (González-Centeno, 2013; Pradal et al., 2016; Kazemi et al., 2016).

- **Extracción de pectinas asistida acústicamente**

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de ultrasonidos para intensificar el proceso de extracción de pectinas a partir de materiales vegetales; los estudios publicados coinciden en señalar que los ultrasonidos parecen ser una alternativa viable para la extracción de pectinas, ya que no sólo aumentan el rendimiento de la operación, sino también reducen el tiempo de extracción respecto al proceso convencional (Bagherian et al., 2011; Minjares-Fuentes et al., 2014; Xu et al., 2014; Maran & Priya, 2015; Wang et al., 2015; Grassino et al., 2016; Wang et al., 2016b).

En la bibliografía, diferentes autores han estudiado el efecto de la aplicación de energía acústica en procesos de extracción de pectinas en un rango de 35-80°C (Bagherian et al., 2011; Minjares-Fuentes et al., 2014; Maran & Priya, 2015; Wang et al., 2015; Grassino et al., 2016). Las pectinas pueden sufrir degradación no enzimática debido al tratamiento térmico, provocando una disminución en su peso molecular y por lo tanto una pérdida en sus propiedades funcionales (Diaz et al., 2007). Por ello, en estudios de reciente publicación se ha evaluado la extracción acústica de pectinas a temperaturas inferiores a 30°C (Wang et al., 2016a; Xu et al., 2014). Estos estudios son aún muy escasos, y resultan de gran interés tanto desde el punto de vista de la mejora energética del proceso, como de la calidad de las pectinas.

Se dispone de escasa información relativa a la interacción de los ultrasonidos con factores como el pH en los procesos de intensificación de transferencia de materia (Minjares-Fuentes et al., 2014), de tal manera que no se han encontrado trabajos publicados relativos al análisis del efecto de la asistencia acústica en procesos de extracción ni en la composición de pectinas obtenidas a partir de subproductos de naranja a diferentes pH y tiempos de operación.

1.3.3. Modelización y simulación de los procesos de extracción sólido-líquido

La modelización constituye una herramienta de gran utilidad para la simulación, optimización, control y diseño de procesos alimentarios, gracias a su capacidad para describir y predecir el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones de operación.

La simulación de procesos mediante modelos matemáticos constituye una poderosa herramienta de cálculo y diseño, que surgió y se desarrolló con la aparición de los ordenadores, y que poco a poco se ha ido imponiendo gracias a la creciente velocidad y capacidad de trabajo que los mismos han ido ofreciendo.

En la modelización de procesos de transformación de materiales biológicos, estos presentan una complejidad adicional debido al carácter heterogéneo de los mismos (Rodríguez, 2014).

En el planteamiento matemático del modelo, una vez determinadas las variables que intervienen en el proceso, deben establecerse las relaciones matemáticas existentes entre las mismas para definir las ecuaciones representativas. Estas relaciones matemáticas pueden ser de carácter **fenomenológicos** o **empíricos**. Los modelos **fenomenológicos**, son capaces de describir cuantitativamente un proceso particular y son desarrollados a partir de principios físicos, basándose en diferentes hipótesis y consideraciones. Los modelos **empíricos**, en cambio, son obtenidos a través del análisis matemático o estadístico de los datos del proceso, razón por

la cual carecen de significado físico. Sin embargo resultan de gran utilidad para ciertas aplicaciones industriales o para simplificar el estudio de sistemas complejos, difícilmente formulables y/o solucionables mediante modelos fenomenológicos. Tal es el caso de la extracción de compuestos bioactivos de materiales de origen natural, dada la heterogeneidad de las muestras y la complejidad del mecanismo de transferencia de materia debido al carácter multicomponente de las mismas. En la bibliografía también se dispone de los denominados modelos semi-empíricos, entendidos como aquéllos que utilizan estimaciones empíricas y leyes físicas simultáneamente, para dar un cierto significado físico a los parámetros cinéticos del sistema (Rodríguez, 2014).

1.3.4. Modelo de Weibull

El modelo empírico de Weibull está basado en una función probabilística utilizada para predecir el comportamiento de sistemas complejos variantes. Concretamente, en el campo de la tecnología de alimentos, el modelo de Weibull ha sido ampliamente utilizado para describir procesos degradativos, inactivación enzimática, crecimiento y supervivencia de microorganismos, secado de alimentos, digestión *in vitro* y/o degradación química de los atributos de un producto (Soliva-Fortuny et al., 2006; Uribe et al., 2011; Pradhan et al., 2012; Cox et al., 2012; Eim et al., 2013; Dalmau et al., 2017). También se ha aplicado satisfactoriamente a estudios relativos a cinéticas de extracción (Ver Tabla 1.1).

El modelo de Weibull consiste en una ecuación exponencial (Ecuación 1.1), donde: Y es la concentración, Y_{max} es la concentración final y Y_0 es la concentración inicial del analito a extraer. El parámetro α está relacionado con la cinética del proceso, presentando una relación inversa con la constante de velocidad del mismo; y β es un parámetro de forma característico del material, que se asimila como un índice de su comportamiento durante el proceso (Sturzoiu & Stroescu, 2011). La inclusión del parámetro de forma además del parámetro cinético α , es lo que confiere al modelo de Weibull flexibilidad y potencial para describir un gran número de procesos (González-Centeno, 2013).

Ecuación 1.1

$$\frac{Y-Y_{max}}{Y_0-Y_{max}} = e^{\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]}$$

Tabla 1.1: Revisión bibliográfica. Uso del modelo de Weibull para representar cinéticas de extracción de compuestos a partir de materia prima vegetal.

Materia prima	Extractos	Bibliografía
Rosa mosqueta	β -caroteno	(Sturzoiu & Stroescu, 2011)
Hongos medicinales	Sólidos solubles	(Cheung et al., 2013)
Orujo de uva tinta	Antocianos	(Sant'Anna et al., 2013)
Pepitas de quinoa	Saponinas	(Quispe-Fuentes et al., 2013)
Cacao	Manteca de cacao	(Rodríguez et al., 2014)
Hierba de San Juan	Resina	(Kitanović et al., 2008)
Orujo de uva	Compuestos fenólicos	(González-Centeno et al., 2015)

2. OBJETIVOS

Los residuos de la industria alimentaria tienen un elevado potencial al ser ricos en biocompuestos. Los subproductos de naranja son ricos en fibra alimentaria, de la cual cabe destacar las pectinas por sus múltiples aplicaciones.

El objetivo principal del presente trabajo consistió en **evaluar la aplicación de la energía acústica como tecnología para intensificar el proceso de extracción de pectinas de subproductos de naranja (var. *Navelina*), utilizando un ácido orgánico (ácido cítrico) como disolvente, potenciando así su posible uso alimentario**. Para la consecución de este objetivo general se plantearon como objetivos concretos:

- Evaluar el efecto de la potencia acústica y el pH del medio en el rendimiento del proceso de extracción de pectinas.
- Determinar el efecto de la potencia acústica y del pH del medio en la calidad de los extractos de pectinas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

La materia prima, naranja var. *Navelina*, se adquirió en mercados locales en Palma de Mallorca (España). Para el estudio se utilizaron únicamente los subproductos de la naranja después de extraer el zumo, incluyendo el flavedo y el albedo así como también el eje central y los septos (ver Figura 3.1).

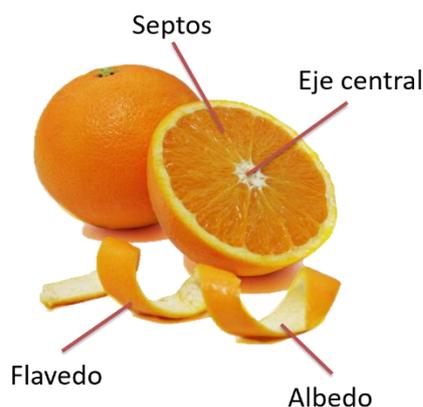


Figura 3.1: Subproductos de la naranja

3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.2.1. Acondicionamiento de los subproductos de la naranja

Previo descarte de aquellas piezas que presentaban algún tipo de daño fisiológico por golpe mecánico, las naranjas se seleccionaron según su grado de maduración, determinándose el contenido en sólidos solubles. Como materia prima para el presente trabajo, se seleccionaron aquellas naranjas cuyo zumo presentó un contenido en sólidos solubles de 11.0 ± 0.5 °Brix.

Con el objetivo de estabilizar y obtener un subproducto homogéneo, la materia prima se sometió a un proceso de acondicionamiento. Se generó un concentrado de piel de naranja (CPN) a partir de 16.3 kg de naranjas. Este procedimiento (Figura 3.2) incluyó la extracción del zumo, el escaldado, liofilizado, molido y tamizado de la muestra, procesos que se describen a continuación.

En primer lugar cada pieza se cortó transversalmente, seguidamente se extrajo el zumo con un exprimidor automático (Fagor, España). Cada una de las mitades de piel se cortó en cuatro partes y se sometió a un proceso de escaldado con vapor de agua a 100°C durante 5 min, con el fin de inactivar las enzimas y preservar los biocompuestos de interés. Seguidamente la muestra se congeló a -80°C en un ultra-congelador (CVF 525/86 Ing. Climats, España) y liofilizó (LyoQuest, Telstar, España) a 0.3 mbar y -50°C .

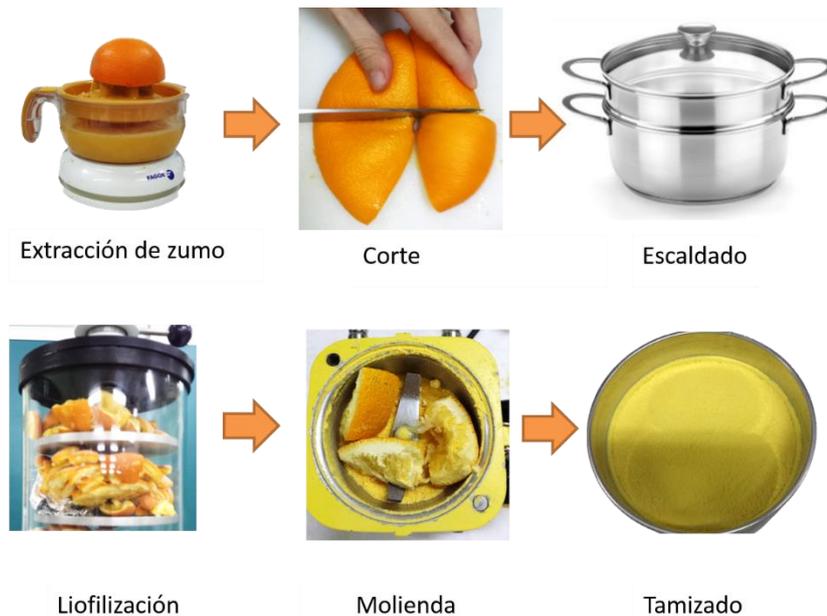


Figura 3.2: Procedimiento de obtención del concentrado de piel de naranja.

Posteriormente, la muestra liofilizada se molió (A10, Ika Werke, Alemania) y se tamizó (FIT-0200, Filtra, España), seleccionándose la fracción de tamaño de partícula comprendida entre 0.355 mm a 0.710 mm (Figura 3.3). Todo el procedimiento descrito (Figura 3.2) se realizó con el objetivo de estabilizar y obtener una materia prima homogénea adecuada para la extracción de pectinas.



Figura 3.3: Concentrado de piel de naranja (CPN)

Finalmente la muestra tamizada se envasó en porciones de 50 g al vacío mediante el uso de una máquina de envasado al vacío (EVT-10, Tecnotrip, España), en bolsas de películas de poliamida/polietileno 20/70 con permeabilidad al O_2 $2.58 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, suministradas por Guerrero Coves SL (Valencia, España). Las mismas se conservaron a 4°C y protegidas de la luz hasta su procesado. Este concentrado de piel de naranja (CPN) fue la materia prima utilizada, para llevar a cabo los experimentos de extracción de pectinas.

3.2.2. Determinación de la capacidad calorífica del solvente de extracción

Se utilizó como solvente de extracción una disolución de ácido cítrico a pH 1.5 y 2.0. La capacidad calorífica de la misma se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC 2920, TA Instruments, Estados Unidos) a partir de la Ecuación 3.1.

Ecuación 3.1

$$Cp = \frac{x}{x'} x' \frac{m'}{m} Cp'$$

Donde:

- Cp : Capacidad calorífica de la muestra ($J\ kg^{-1}\ K^{-1}$)
- x : Diferencia entre el flujo de calor registrado de la muestra y una cápsula vacía a la misma temperatura ($J\ s^{-1}$).
- x' : Diferencia entre el flujo de calor registrado del zafiro y una cápsula vacía a la misma temperatura ($J\ s^{-1}$).
- m' : Masa del zafiro (g).
- m : Masa de la muestra (g).
- Cp' : Capacidad calorífica del zafiro ($J\ kg^{-1}\ K^{-1}$).

3.2.3. Determinación de la potencia de los equipos de ultrasonidos. Estudio calorimétrico

Con el objetivo de establecer la densidad acústica ($W\ L^{-1}$) suministrada al sistema, se procedió a realizar una calibración por calorimetría. Esta metodología consiste en la determinación del incremento de temperatura del disolvente de extracción que tiene lugar durante los primeros minutos de la aplicación de ultrasonidos, sin presencia de muestra y sin termostatar el sistema (Raso et al., 1999). La temperatura del medio se registró cada segundo durante los primeros 5 min de aplicación de US, mediante una sonda (N2014, Comark, Korea). El cálculo de la densidad acústica se realizó empleando la Ecuación 3.2 (Sivakumar & Pandit, 2001), a partir de la curva de temperatura-tiempo determinada experimentalmente por triplicado.

Ecuación 3.2

$$\text{Densidad acústica} = \frac{dT}{dt} Cp m$$

Donde

- Cp : Capacidad calorífica en $J\ kg^{-1}\ K^{-1}$ del solvente
- dT : Diferencial de temperatura ($^{\circ}C$)
- dt : Diferencial de tiempo (s)
- m : masa del disolvente (kg)

3.3. EQUIPOS DE EXTRACCIÓN

3.3.1. Equipo extractor I: agitación mecánica

Para llevar a cabo la extracción con agitación mecánica, se utilizó un agitador convencional (RZR 2021, Heidolph, Alemania) dotado con una hélice de cuatro álabes que describían un círculo de 50 mm de diámetro a una velocidad de giro de 82 rpm (Figura 3.4) y un vaso encamisado con una capacidad de 250 ml conectado a un baño termostático (Thermomix 1441, Braun, Alemania) para mantener una temperatura constante ($T= 25\pm 2^{\circ}C$) durante el proceso de extracción. El agitador se situó en el eje central del vaso y en el centro del volumen de líquido.

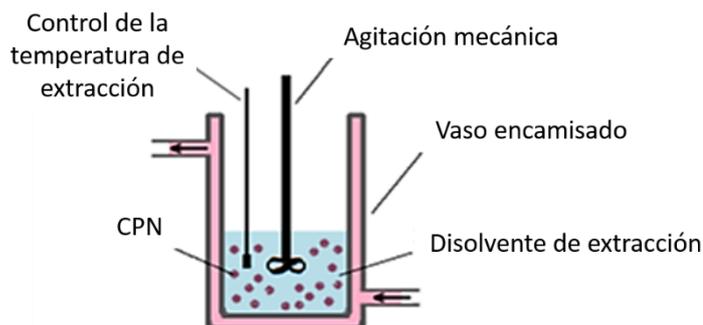


Figura 3.4: Equipo de extracción con agitación mecánica

3.3.2. Equipo extractor II: ultrasonidos de potencia

La extracción se llevó a cabo con un procesador de ultrasonidos UP400S (Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) con una frecuencia de 24 kHz al cual se le acoplaron sondas o sonotrodos de diferentes diámetros (14 mm y 40 mm de diámetro y una longitud de 100 mm) (Figura 3.6) que permiten trabajar con potencias diferentes. Se utilizó un vaso encamisado de 250 ml de capacidad conectado a un baño termostático (Selecta, Tectron Bio, España) ($T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$). La sonda se colocó en el eje central del vaso siempre en la misma posición (Figura 3.5).

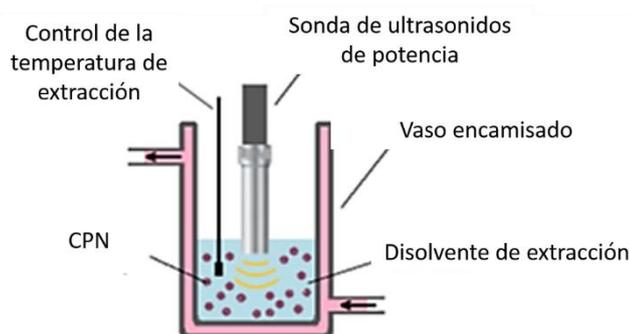


Figura 3.5: Equipo de extracción con ultrasonidos de potencia



Figura 3.6: A- Procesador de ultrasonidos de potencia UP400S. B- Sonda de 14 mm de diámetro. C-Sonda de 40 mm de diámetro.

Las condiciones experimentales establecidas, análogas para todas las experiencias de extracción acústica realizadas con este equipo, fueron 100% de amplitud y ciclos de 0.5s.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En base a poder evaluar el efecto del pH del disolvente y la potencia acústica aplicada sobre la transferencia de materia y la calidad de las pectinas en el proceso de extracción, y por tanto para alcanzar el objetivo principal de este trabajo, primeramente se caracterizó el concentrado de piel de naranja, mediante la determinación del contenido de humedad, el color, el contenido en fibra dietética total y el contenido de monosacáridos (azúcares neutros y ácidos urónicos).

Seguidamente se realizaron dos series de experimentos, con el objeto de obtener las cinéticas de extracción, ambas a dos diferentes pH de la solución de ácido cítrico: 1.5 y 2.0. La primera serie consistió en experiencias de extracción de pectinas asistida acústicamente, y la segunda serie (control) consistió en extracciones realizadas con agitación mecánica.

Por último, se analizó el color, la microestructura, la composición de monosacáridos (azúcares neutros y ácidos urónicos) y polisacáridos de los extractos obtenidos y con la finalidad de conocer la calidad de las pectinas presentes en dichos extractos se determinaron sus características estructurales así como su grado de metilesterificación. Estas determinaciones se llevaron a cabo en los extractos obtenidos a 30 y 60 min de operación, con el fin de evaluar el efecto del tiempo de extracción. En la Figura 3.7 se muestra un esquema del diseño experimental de la investigación.

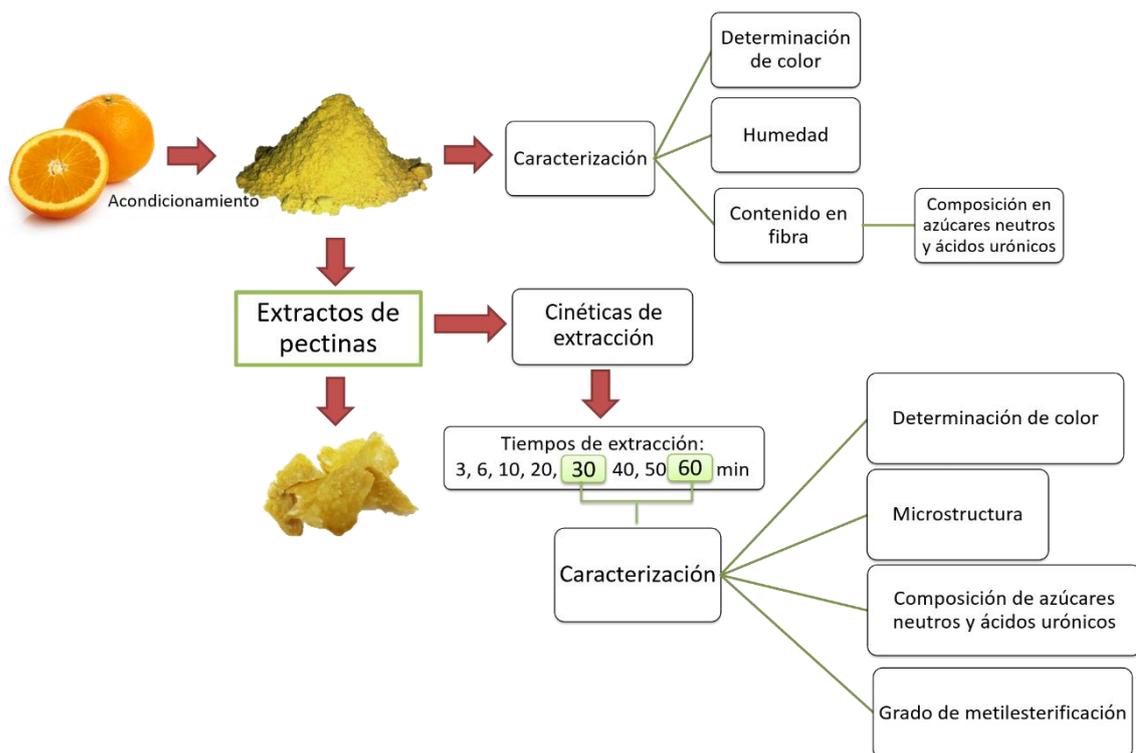


Figura 3.7: Esquema del diseño experimental de la investigación.

3.4.1. Proceso de extracción

El concentrado de piel de naranja se sometió a un proceso de extracción haciendo uso de los equipos de extracción mecánica (apartado 3.3.1) y con asistencia acústica (apartado 3.3.2) con una relación de CPN/disolvente de 3/100 (w/v, g/ml). Como disolvente de extracción se utilizó una disolución de ácido cítrico a pH 1.5 y 2.0 y la temperatura se fijó en $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Las extracciones asistidas por ultrasonidos se realizaron a dos densidades acústicas diferentes y tiempos de extracción de 3, 6, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min. En la Figura 3.8 se presenta un esquema con las variables estudiadas en el proceso de extracción de pectinas, tomando como control las extracciones mecánicas. Cada serie de experimentos, se realizó por triplicado.



Figura 3.8: Experimentos de extracción de pectinas

Después de la extracción se procedió según la metodología propuesta por Panchev & Kirtchev (1989) y Canteri-Schemin et al. (2005). Se filtró la mezcla de ácido cítrico con CPN a través de una malla con un tamaño de abertura de ~ 0.5 mm. El sólido se descartó y el filtrado líquido se trató con dos veces su volumen de etanol 96% con el objetivo de precipitar las pectinas y se homogenizó con un agitador magnético durante 10 min. Finalmente se centrifugó a 4,000 rpm (4218, ALC, Italia) durante 30 min para precipitar las pectinas. El extracto se separó por filtración al vacío utilizando filtros Whatman GF/C (filtro de microfibras de vidrio, libre de celulosa). Se lavó una vez con 50 ml de acetona.

Los extractos se secaron a temperatura ambiente durante 12 h. El rendimiento se calculó como g de producto extraído por 100 g de CPN b.s. sometido a extracción. Los rendimientos se expresaron en función del tiempo para la obtención de las cinéticas.

3.5. ANALISIS FÍSICO-QUÍMICOS

3.5.1. Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad del CPN se siguió el procedimiento descrito por la AOAC número 934.06 (AOAC, 1997). Se secaron aproximadamente 2.0±0.2 g de muestra en una estufa de vacío (Vaciotem-T, Selecta, España) a 80±2°C hasta peso constante (aproximadamente 24 h). A partir de la variación de peso se calculó el valor del contenido de humedad y el resultado se expresó en g agua/ 100 g de CPN en base húmeda (b.h).

3.5.2. Determinación de color

La determinación física del color se realizó en el CPN y los extractos utilizando un espectrofotómetro (CM5, Konica Minolta, Japón) con componente especular excluido, iluminante D65, una apertura de 30 mm y un observador con un ángulo de 10°. Se utilizaron las coordenadas CIELab* (Wang et al., 2015; Masmoudi et al., 2012); determinándose los valores de L* (luminosidad), a* (define la desviación del punto acromático hacia el rojo si a* > 0, hacia el verde si a* < 0) y b* (define la desviación hacia el amarillo si b* > 0, hacia el azul si b* < 0) (Drake & Drake, 2011).

La diferencia total de color ΔE (Ecuación 3.3) (Constenla et al., 2016), se calculó tomándose como referencia el color blanco. Siendo L₀, a₀, y b₀, los valores correspondientes al color blanco en el espacio CIELab* (L₀=100, a₀=0 y b₀=0) (Pérez et al., 2016).

Ecuación 3.3
$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2}$$

3.5.3. Microestructura: microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microestructura de los extractos se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Minjares-Fuentes et al. (2014). Las muestras de extracto se fijaron en el soporte con adhesivos de carbón, y se observaron directamente en el microscopio electrónico de barrido (S-3400N, Hitachi, Japón) a resolución 5 μm, voltaje de aceleración de 10 kV, y presión de trabajo de 40 Pa. Las imágenes se adquirieron a 100x de aumentos.

3.5.4. Extracción de la fibra alimentaria. Residuo insoluble en alcohol (AIR)

Con el objeto de determinar el contenido en fibra y la composición de los principales tipos de polisacáridos presentes en el CPN se procedió a la extracción de los polisacáridos, mediante su precipitación en alcohol (Eim et al., 2013).

El residuo insoluble en alcohol se obtuvo a partir del concentrado de piel de naranja, para ello se pesaron 1.5 g del CPN y se añadieron 100 ml de etanol 85%, se homogeneizó durante 1 min a 13,000 rpm mediante un Ultra-Turrax (T25 Digital IKA, Staufen, Germany). A continuación, la mezcla se llevó a ebullición durante 5 min y luego se filtró al vacío utilizando filtros Whatman GF/C (filtro de microfibras de vidrio, libre de celulosa). El filtrado se suspendió nuevamente en etanol 85%. La mezcla se homogeneizó y se llevó a ebullición, ambos procesos durante 1 min, y posteriormente se filtró nuevamente. El proceso anterior se repitió con etanol absoluto. Finalmente, la muestra se lavó con acetona. El disolvente se evaporó a temperatura ambiente, dejando un residuo insoluble en alcohol, formado mayoritariamente por los componentes que

forman las paredes celulares de la piel de naranja. El rendimiento de AIR se expresó en gramos de AIR por cada 100 g de CPN.

El residuo insoluble en alcohol ha sido la materia sobre la cual se han realizado las determinaciones de contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos para el CPN.

3.5.5. Identificación y cuantificación de azúcares

El análisis de los monosacáridos se llevó a cabo en el AIR del CPN y en los extractos de polisacáridos obtenidos.

Los azúcares, unidades básicas de los diferentes tipos de polisacáridos que forman las paredes celulares del CPN y de los extractos obtenidos, se liberaron mediante un proceso de hidrólisis ácida según la metodología descrita por González-Centeno et al. (2010) y Rodríguez-González et al. (2011).

Para cada una de las muestras se pesaron aproximadamente unos 5 mg y se mezclaron con 200 μL de H_2SO_4 12 M (equivalente al 70% (v/v)) y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 h. Luego se adicionaron 2.2 ml de agua destilada (concentración final de H_2SO_4 1 M) y se incubaron a 100°C , en un bloque seco durante 2.5 h produciéndose así la hidrólisis total de los diferentes tipos de azúcares. Para la determinación de los ácidos urónicos, el proceso de hidrólisis es igual, pero la fase de incubación a 100°C sólo se realizó durante 1 h.

- **Azúcares neutros**

Una vez que las muestras fueron hidrolizadas, a cada una de ellas se les añadió 200 μl de 2-deoxyglucosa (1 mg ml^{-1}) como patrón interno, con el objetivo de determinar de forma cuantitativa la presencia de ramnosa (Rha), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xyl), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc).

Seguidamente, 1 ml de hidrolizado se neutralizó con 200 μL de NH_3 25%. Y se adicionó 100 μL de NH_3 3 M que contenía NaBH_4 al 15 % w/v como agente reductor, así se consiguió la rotura de los ciclos que presentan los azúcares en su estructura y su paso a alditoles (reducción del grupo aldehído a alcohol). Posteriormente, se incubó durante 1 h a 30°C . Una vez enfriadas se añadieron 450 μl de 1-metil-imidazol, como catalizador, y 3 ml de anhídrido acético, se homogeneizó e incubó a 30°C durante 30 min. De esta forma se consiguió el paso a alditol acetatos, compuestos detectables mediante cromatografía de gases. Estos compuestos se extrajeron con diclorometano. La fase orgánica con los alditoles acetatos se separó mediante centrifugación, para posteriormente eliminar la fase acuosa por aspiración. Posteriormente el diclorometano se evaporó mediante una corriente de argón a 40°C .

Los azúcares neutros, derivatizados y convertidos en sus correspondientes alditoles acetatos, se separaron isotérmicamente a 220°C mediante cromatografía de gases. Se utilizó una columna capilar del tipo OV225 con 3% Chromosorb WHP 100/120 (Hewlett-Packard 5890A, Waldbronn, Alemania). Se utilizó Ar como gas portador con un caudal de 20 ml/min. Las temperaturas del inyector y del detector FID se programaron a 230°C y 240°C , respectivamente.

- **Ácidos urónicos**

El contenido de ácidos urónicos (UA) de las pectinas extraídas se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). El ácido

galacturónico disuelto en ácido benzoico saturado se utilizó como patrón para la determinación de la recta de calibrado (rango de concentración de la recta 0–80 µg de ácido galacturónico/ml).

Para la obtención de la recta de calibrado se introdujeron tubos de ensayo, en un baño de agua-hielo, se añadió a cada tubo 3 ml de una disolución 50 mM de borato de sodio en H₂SO₄ concentrado, seguidamente se adicionaron, 0.5 ml de la disolución estándar de ácido galacturónico y se incubaron durante 10 min a 100°C. Seguidamente, se introdujeron durante 2 min en un baño de agua-hielo y se les añadió 100 µl de una disolución de m-fenilfenol (al 0.15% en peso en NaOH al 0.5% en peso como disolvente), a todos los tubos excepto a los blancos, ya que este compuesto reacciona con el grupo ácido de la molécula de ácido galacturónico dando un tonalidad rosada a la disolución. Pasados unos 20 min se leyó la absorbancia de cada uno de los tubos con un espectrofotómetro UV visible (UV-2401PC, Shimadzu, Japón) a 524 nm y se obtuvo la recta de calibrado.

Para la determinación de los ácidos urónicos presentes en las diferentes muestras se procedió de forma análoga, introduciendo 0.5 ml de hidrolizado de cada una de las muestras en lugar de la solución estándar de ácido galacturónico. La determinación de la absorbancia permitió, a partir de la recta de calibrado, obtener la cuantificación de los ácidos urónicos presentes en cada una de las muestras. Todas las determinaciones se realizaron como mínimo por triplicado.

- **Composición en polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y pectinas**

Como se ha mencionado anteriormente, las pectinas son polisacáridos complejos formados principalmente por una cadena de HG y cadenas de RGI. La primera se compone por unidades de ácido galacturónico y la segunda contiene principalmente ramnosa, arabinosa y galactosa (Willats et al., 2006). La celulosa por su parte está compuesta por glucosa; se consideró que la mayoría (90%) de la glucosa liberada tras la hidrólisis pertenecía a estructuras celulósicas (Eim et al., 2013; Femenia et al., 2009). El grupo de las hemicelulosas está compuesto por heteropolímeros entre los que destacan los xiloglucanos y los glucomanos (González-Centeno, 2013). Considerando la composición de los polímeros presentes en la pared celular, se calculó de forma aproximada la proporción de pectinas, celulosa y hemicelulosa del CPN y los extractos a partir de las ecuaciones 3.4, 3.5 y 3.6.

$$\text{Ecuación 3.4} \quad \% \text{pectinas} = \frac{[Rha] + [Ara] + [Gal] + [UA]}{\text{Azúcares totales}} \cdot 100$$

$$\text{Ecuación 3.5} \quad \% \text{celulosa} = \frac{0.9 \cdot [Glc]}{\text{Azúcares totales}} \cdot 100$$

$$\text{Ecuación 3.6} \quad \% \text{hemicelulosa} = \frac{[Fuc] + [Xyl] + [Man] + 0.1 \cdot [Glc]}{\text{Azúcares totales}} \cdot 100$$

- **Estructura de las pectinas**

Con el objetivo de conocer la estructura de las pectinas presentes en los extractos, se calcularon tres ratios molares. Se dividió el contenido en moles de los ácidos urónicos entre los demás azúcares pécticos (ramnosa, galactosa y arabinosa) para conocer la linealidad de las pectinas extraídas (Ecuación 3.7). Las cadenas de RGI son las más frecuentes en las pectinas y considerando que están unidas a la cadena principal por unidades de ramnosa, la división entre el contenido en moles de ácido urónico y ramnosa será inversamente proporcional a la cantidad de cadenas (Ecuación 3.8). La longitud de las cadenas se calculó dividiendo el contenido en moles

de galactosa más arabinosa entre los moles de ramnosa (Ecuación 3.9) (Kaya et al., 2014; W. Wang et al., 2015, 2016b). (Figura 3.9).

Ecuación 3.7
$$Linealidad = \frac{UA}{Rha+Gal+Ara}$$

Ecuación 3.8
$$Cantidad\ de\ cadenas = \frac{UA}{Rha}$$

Ecuación 3.9
$$Longitud\ de\ cadenas = \frac{Gal+Ara}{Rha}$$

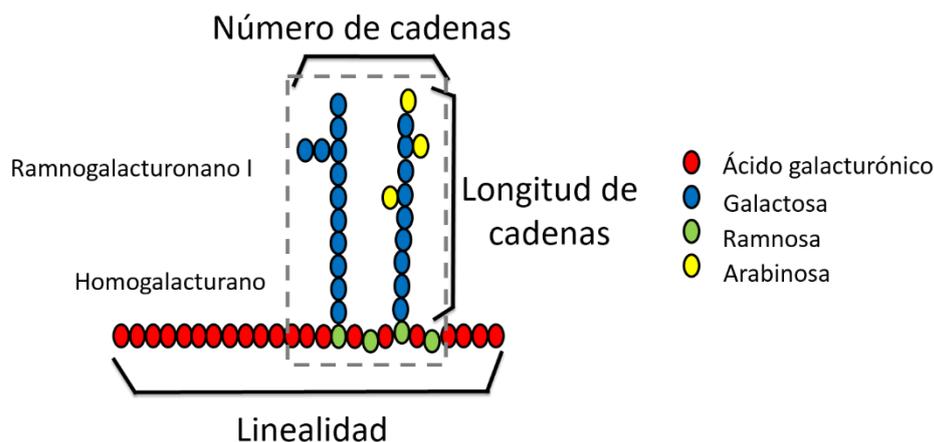


Figura 3.9: Linealidad, cantidad de cadenas y longitud de cadenas laterales de las pectinas

3.5.6. Determinación del grado de metilesterificación (GME) de las pectinas

El GME de las pectinas, se determinó mediante espectroscopia infrarroja FTIR siguiendo el método descrito por Manrique & Lajolo (2002).

Para ello, se mezcló 0.1 g de la muestra de extracto pulverizado y 1 g de KBr (proporción 1: 10; extracto: KBr). Se hizo una pastilla con la ayuda de la prensa hidráulica y se analizó por FTIR (IFS 66, Bruker, Estados Unidos) de resolución 3 cm⁻¹. De esta forma se obtuvo el espectro con las diferentes bandas que presenta el extracto.

El GME se determinó calculando la relación entre el área del pico correspondiente a la vibración de los grupos carboxilo metilesterificados y la suma de ésta área más el área correspondiente a la vibración de los grupos carboxilo libres (ver Ecuación 3.10). Dicha relación se sustituyó luego en la ecuación propuesta por Manrique & Lajolo (2002) (Ver Ecuación 3.11).

Ecuación 3.10
$$R = \frac{A_{1740}}{A_{1740}+A_{1630}}$$

Ecuación 3.11
$$GME = 124.7R + 2.2013$$

Donde A₁₇₄₀ y A₁₆₃₀ representan las intensidades de absorbancia de las bandas a 1740 cm⁻¹ (grupos carboxilo metilesterificados) y 1630 cm⁻¹ (grupos carboxilo libres). Los espectros de todas las muestras se realizaron por triplicado.

3.6. MODELIZACIÓN

Con el objetivo de modelizar las cinéticas de extracción se utilizó el modelo de Weibull (Ecuación 1.1). La identificación de los parámetros del modelo, para cada experimento se realizó utilizando SOLVER, una herramienta de optimización (método GRG2) incluida en la hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010. Se utilizó como función objetivo a minimizar el error relativo medio (ERM) (Ecuación 3.12), obtenido por comparación entre los valores experimentales y los calculados por el modelo. Se identificaron los parámetros Y_{\max} , α y β , para cada experimento de extracción. Se consideró Y como el rendimiento de extracción y Y_{\max} y Y_0 como el rendimiento inicial y final respectivamente. Posteriormente se calculó el valor medio y la desviación de cada parámetro y con dichos valores se llevó a cabo la simulación de los experimentos de extracción S-L realizados.

3.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Todos los resultados experimentales se presentaron como la media \pm desviación estándar de las n mediciones realizadas. El estudio de la variabilidad de las muestras respecto a los diferentes parámetros analizados se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico R (versión 2.14.2, R Foundation for Statistical Computing, Austria). Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos para todas las variables en estudio, utilizando el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente. Cuando la población siguió una distribución normal y presentó homogeneidad de varianzas, se determinó la existencia de diferencias significativas, mediante el test paramétrico ANOVA de tres vías, evaluando: pH (1.5 y 2.0), tiempo de extracción (30 y 60 min) y tratamiento (Control y extracción mediante asistencia acústica en las dos potencias estudiadas), y se utilizó el test paramétrico Tukey para evaluar el grado de dichas diferencias. Dichos análisis estadísticos fueron sustituidos por los correspondientes test no paramétricos, Kruskal-Wallis y Pairwise-Wilcox (con corrección BH), cuando los datos no presentaron una distribución normal y/o presentaban heterogeneidad de varianzas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Para evaluar la correlación entre los valores experimentales (Y_{exp}) y los calculados por el modelo matemático propuesto (Y_{calc}) y, consecuentemente, la calidad del ajuste de los mismos, se utilizaron los parámetros error relativo medio (ERM, Ecuación 3.12) y/o el porcentaje de varianza explicada (VAR, Ecuación 3.13) (González-Centeno, 2013):

$$\text{Ecuación 3.12} \quad \text{ERM} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{|Y_{\text{exp}} - Y_{\text{calc}}|}{Y_{\text{exp}}} \right)}{n} \times 100$$

$$\text{Ecuación 3.13} \quad \text{VAR} = \left(1 - \frac{S_{\text{exp}}^2}{S_{\text{calc}}^2} \right) \times 100$$

Donde n es el número de experiencias; S_{exp} la desviación estándar de los valores experimentales; y S_{cal} la desviación estándar de los valores calculados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objeto de intensificar el proceso de extracción y evaluar el efecto del pH del disolvente y de la aplicación de ultrasonidos, se utilizó como materia prima un concentrado de piel de naranja (CPN).

En esta sección se presentan, en primer lugar, los resultados obtenidos relativos a la determinación de la capacidad calorífica del solvente (solución de ácido cítrico) y de la potencia acústica de las dos sondas caracterizadas.

Posteriormente se detalla y discuten los resultados obtenidos en la caracterización del CPN. Seguidamente se presentan los resultados obtenidos en los experimentos de extracción, evaluando los efectos del pH del disolvente y de la potencia acústica aplicada. Finalmente se presentan los resultados de la composición de los extractos obtenidos.

El análisis de los resultados obtenidos en los experimentos de extracción S-L asistidos acústicamente se llevó a cabo utilizando como control, los experimentos realizados con agitación mecánica.

4.1. CAPACIDAD CALORÍFICA DEL SOLVENTE DE EXTRACCIÓN

Se determinó, la capacidad calorífica de las dos soluciones de ácido cítrico utilizadas en el estudio (pH 1.5 y 2.0) según la metodología descrita en el apartado 3.2.2. La capacidad calorífica de las soluciones de ácido cítrico no presentaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$), siendo su valor de $4305 \pm 102 \text{ J kg}^{-1}\text{K}^{-1}$ para 25°C , el cual es muy similar al del agua para la misma temperatura ($4180 \text{ J kg}^{-1}\text{K}^{-1}$).

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS SONDAS DE ULTRASONIDOS.

La densidad de la potencia acústica generada por las sondas de ultrasonidos de 14 mm y 40 mm de diámetro, se determinó mediante calorimetría (apartado 3.2.3). En la Tabla 4.1 se detalla la densidad acústica obtenida.

Tabla 4.1: Densidad acústica de las sondas estudiadas

Sonda (diámetro mm)	Densidad acústica (W L^{-1})
14	794±4
40	542±4

4.3. CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO DE PIEL DE NARANJA

Con el objetivo de obtener un material estable y homogéneo, que sea adecuado como materia prima para la extracción de pectinas, se procedió a la obtención del CPN según la metodología descrita en el apartado 3.2.1. En la Tabla 4.2 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización físico-química del CPN que incluye el análisis del contenido de humedad, fibra dietética y color.

Tabla 4.2: Características físico químicas del concentrado de piel de naranja.

Humedad (% b.h.)	6.5±0.1
Fibra dietética (g AIR/100 g de CPN)	40.6±0.6
Color	
a*	5.2±0.1
b*	47.9±0.4
L*	83.5±0.2

El bajo contenido de humedad del CPN (6.5% b.h.) le confiere estabilidad, lo que indica que el acondicionamiento realizado fue adecuado. La utilización del residuo insoluble en alcohol (AIR) como método de cuantificación de fibra alimentaria sólo es adecuada para frutas y hortalizas que presentan bajo contenido en almidón debido a que éste precipita junto a los demás polisacáridos. Según la bibliografía consultada (Mosa & Kkalil, 2015) la piel de naranja se encuentra prácticamente libre de almidón, por tanto el método AIR se consideró adecuado. En la bibliografía se han encontrado datos de contenido de fibra en el flavedo de la piel de naranja que varían en el rango de 45.2 a 69.1 % b.s. (Larrauri et al., 1996; Garau et al., 2007; Mandalari et al., 2006). El contenido en fibra dietética o residuo insoluble en alcohol de la materia prima fue de 42.8 % b.s., las diferencias observadas entre estos autores y el presente trabajo podría deberse a que en el presente estudio se incluyó el flavedo y el albedo, a la variedad de la naranja así como también a las diferencias en el método analítico utilizado ya que no existe un método oficial para la determinación de DF (Westenbrink et al., 2013).

Respecto al color de CPN, en comparación con los obtenidos en la bibliografía para la piel de la naranja fresca (Garau et al., 2007), destaca que la muestra CPN es más luminosa y que presenta una cierta decoloración. Para la muestra CPN se obtuvieron valores más altos de L* (83.5 para el CPN y 69.7 para la piel de naranja fresca), y valores más bajos de a* y b* (a* = 16.3 y b*=69.5 para la naranja fresca), esto indica que el proceso de acondicionamiento provocó cierta pérdida de color.

Los azúcares más abundantes en el AIR del CPN (Tabla 4.3) fueron los ácidos urónicos, la arabinosa y la glucosa. En el trabajo realizado por Kaya et al. (2014), se describieron también los ácidos urónicos (35.6% molar), la arabinosa (15% molar) y la glucosa (29.5% molar) como los monosacáridos mayoritarios de la piel de naranja. Este perfil de monosacáridos también es similar con la composición presentada por Mandalari et al. (2006) que indicaron que los ácidos urónicos (32.5%), la glucosa (35.0%) y la arabinosa (12.0%) fueron los monosacáridos mayoritarios en la piel de naranja; los resultados bibliográficos y los presentados en este trabajo son similares, siendo las diferencias atribuibles a las distintas variedades de naranja. La composición en polisacáridos presentes en el AIR del CPN se pudo deducir a partir de la composición en azúcares simples utilizando las ecuaciones 3.4, 3.5 y 3.6. Los polisacáridos de tipo péctico (68% del total de monosacáridos) fueron los predominantes, seguido de la celulosa (20.1%). Por último, las hemicelulosas representaron el 12.2% del total de polisacáridos presentes en el AIR de CPN. Según el perfil de monosacáridos presentado por Mandalari et al., (2006), para la piel de naranja, las pectinas representarían un 54.7% del total, la celulosa un 31.8% y los heteropolímeros pertenecientes al grupo de las hemicelulosas un 13.5%, mientras según la composición en monosacáridos presentada por Kaya et al. (2014) para la piel de naranja, las pectinas representarían un 61.9%, la celulosa un 26.5% y los heteropolímeros

pertenecientes al grupo de las hemicelulosas un 11.6%, siendo estos valores muy similares a los que se reportan en este trabajo.

Tabla 4.3: Composición de azúcares del concentrado de piel de naranja (CPN)

Monosacárido	% molar
Ramnosa	1.8±0.1
Fucosa	0.6±0.1
Arabinosa	26±2
Xylosa	6.2±0.2
Manosa	3.2±0.4
Galactosa	10.5±0.5
Glucosa	22±3
Ácidos urónicos	30±2

En conclusión, las características físico-químicas del CPN indican que es una materia prima adecuada para su uso como fuente de pectinas, razón por la cual ha sido ampliamente usada a nivel industrial para este fin (Casas-Orozco et al., 2015).

4.4. INTENSIFICACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN MEDIANTE APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los experimentos de extracción acústica. Como experimentos de control se considerarán aquellos realizados con agitación mecánica en las mismas condiciones de pH. En la Tabla 4.4 se presenta la nomenclatura que se utilizará en la presentación de resultados.

Tabla 4.4: Nomenclatura de los experimentos de extracción

pH	Tratamiento		Nomenclatura
1.5	Agitación mecánica	82 rpm	Control
	Ultrasonidos	542 W L ⁻¹	US1
	Ultrasonidos	794 W L ⁻¹	US2
2.0	Agitación mecánica	82 rpm	Control
	Ultrasonidos	542 W L ⁻¹	US1
	Ultrasonidos	794 W L ⁻¹	US2

4.4.1. Cinéticas de extracción

En la Tabla 4.5 se presentan los valores correspondientes al rendimiento de la extracción (Y) para los experimentos realizados con agitación mecánica (control) y con aplicación de ultrasonidos a pH 1.5 y 2.0.

Tabla 4.5: Rendimientos del proceso de extracción (g de extracto/100g CPN b.s.)

Tiempo (min)	pH 1.5			pH 2.0		
	Control	US1	US2	Control	US1	US2
3	10.6 ± 0.3	12.8 ± 0.4	20 ± 1	7.1 ± 0.3	9.1 ± 0.8	12.2 ± 0.8
6	14 ± 2	22 ± 3	22.8 ± 0.7	10.2 ± 0.6	10 ± 2	15.9 ± 0.3
10	16 ± 1	25.3 ± 0.8	32 ± 4	9 ± 1	10.9 ± 0.2	16.7 ± 0.4
20	16.6 ± 0.4	31 ± 2	42 ± 3	10.4 ± 0.8	13.1 ± 0.3	18 ± 2
30	16.52 ± 0.03	38 ± 1	47 ± 3	10 ± 1	13 ± 1	17.7 ± 0.3
40	21.7 ± 0.4	39 ± 2	51 ± 2	9.9 ± 0.9	15 ± 1	19.6 ± 0.6
50	20.8 ± 0.7	44 ± 4	56 ± 1	12 ± 1	15.7 ± 0.3	20 ± 2
60	25.3 ± 0.3	44 ± 4	62.7 ± 0.4	11.3 ± 0.3	16 ± 2	20 ± 1

En la Tabla 4.5 puede observarse que existe un evidente efecto del pH sobre las cinéticas de extracción, obteniéndose rendimientos más elevados en el medio con un pH menor. Comparando los rendimientos de los experimentos realizados en las mismas condiciones pero diferente pH, se observaron incrementos del 125%, 170% y 206% en los experimentos control, US1 y US2, respectivamente, a 60 min de extracción, cuando se trabajó con pH 1.5.

En diversos estudios donde se extrajeron pectinas por métodos convencionales, se observó un efecto del pH que coincide con el obtenido en este trabajo; Prakash et al. (2013), observaron que al disminuir el pH se incrementó el rendimiento de la extracción de las pectinas de la piel de naranja; alcanzando un máximo rendimiento a pH 1.4. Happi-Emaga et al. (2008); Levigne et al. (2002); Yapo et al. (2007b), observaron también que el rendimiento de extracción de las pectinas obtenidas a partir de la piel de plátano y de la remolacha, eran más elevados a pH 1.5 que a pH 2.0. El-Nawawi et al. (1987) determinaron que el pH óptimo para la extracción de pectinas a partir de piel de naranja era de 1.7, justificándolo con el hecho de que medios con pH más altos no son capaces de hidrolizar componentes insolubles de las pectinas. Yapo et al. (2009b) sugirieron que el descenso del pH incrementa significativamente la cantidad de pectinas extraídas, probablemente como una consecuencia de la alta eficacia debido a la elevada difusividad del agente de extracción en las paredes celulares.

Por otro lado, cabe destacar que a igualdad de pH, los rendimientos obtenidos en los experimentos asistidos acústicamente, fueron superiores a los obtenidos mediante agitación mecánica a todos los tiempos de operación. En las mismas condiciones de pH se obtuvieron mayores rendimientos cuando se aplicó mayor potencia acústica al medio; a pH 1.5 y 2.0 la aplicación de US1 a 60 min de extracción incrementó el rendimiento un 75 y 46% y US2 un 148 y 82%, respectivamente, tomando como referencia el control. A ambos pH la aplicación de energía acústica aumenta los rendimientos de extracción, y cabe destacar que este incremento es mayor a pH 1.5 que a 2.0. Wang et al. (2015), quienes extrajeron pectinas de piel de pomelos en una solución de HCl a pH 1.5, concluyeron que con asistencia acústica se obtenían rendimientos 16.3% mayores, en un tiempo 37.8% más corto y a una temperatura 13.3°C menor que en una extracción convencional, lo que nos indica que la asistencia acústica es eficiente en la intensificación de procesos de extracción de pectinas.

Al comparar con estudios anteriores sobre la extracción de pectinas por métodos convencionales a partir de subproductos de naranja, tenemos que: el rendimiento máximo

obtenido por Kaya et al. (2014) fue de 24.6 g de extracto rico en pectina/ 100 g piel de naranja b.s. con 7 h de extracción a 70°C utilizando una solución de HNO₃ (pH 1.6) mientras que Zanella & Taranto (2015) obtuvieron un rendimiento máximo de 38.2 g de extracto rico en pectina/ 100 g de piel de naranja b.s. con 2 h de extracción a 80°C utilizando una solución de ácido cítrico (pH 2.5). Tal y como se puede observar, los rendimientos máximos obtenidos por métodos convencionales a partir de piel de naranja en estudios anteriores, son menores que los obtenidos en el presente trabajo, a pesar de utilizar temperaturas mayores y tiempos más largos; posiblemente esto sea consecuencia de diferentes factores: el acondicionamiento previo del subproducto, la variedad de naranja, las condiciones del proceso de extracción, y la existencia o no de un proceso final de purificación que elimine los oligosacáridos y otros azúcares de bajo peso molecular, así como también otros componentes presentes en la materia prima que pudieron haber sido extraídos dando lugar a mayores rendimientos de extracción. En este estudio, cuyo objetivo es analizar el efecto de la aplicación de ultrasonidos en la transferencia de materia en un proceso de extracción frente a un proceso convencional, no se ha considerado necesario llevar a cabo un proceso de purificación.

4.4.2. Modelización de las cinéticas de extracción

Con el fin de describir matemáticamente la transferencia de materia que tiene lugar durante el proceso de extracción se utilizó el modelo de Weibull. A partir de la Ecuación 1.1 y mediante los datos experimentales de rendimiento obtenidos a través de las experiencias realizadas a pH 1.5 y 2.0, tanto con agitación mecánica como con aplicación de ultrasonidos, se identificaron los parámetros α , β y el rendimiento máximo (Y_{max}) del modelo, considerando rendimiento cero para tiempo inicial.

En la Tabla 4.6 se presentan los valores obtenidos para los parámetros identificados del modelo de Weibull en forma de media y desviación estándar.

Tabla 4.6: Parámetros identificados del modelo de Weibull

pH	Tratamiento	Y_{max} (g extracto/g CPN seco)	α (s)	β
1.5	Control	32 ± 2 c	44 ± 5 d	0.34 ± 0.01 c
	US1	62 ± 2 b	2081 ± 18 a	0.58 ± 0.03 a
	US2	88 ± 7 a	2703 ± 365 a	0.55 ± 0.04 ab
2.0	Control	14.8 ± 0.3 e	838 ± 64 b	0.25 ± 0.02 c
	US1	19.2 ± 0.4 d	836 ± 39 b	0.4 ± 0.1 bc
	US2	21 ± 1 d	294 ± 28 c	0.36 ± 0.04 bc

* Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas $p < 0.05$

Se puede observar que Y_{max} varía de forma lineal con respecto a la potencia acústica (considerando la agitación como potencia acústica= 0); tanto a pH 1.5 como 2.0. De modo que para representar dicho efecto se propusieron las siguientes ecuaciones (ver Tabla 4.7) donde US es la densidad acústica en $W L^{-1}$

Tabla 4.7: Ecuaciones propuestas para Y_{max} en función de la potencia acústica

	pH	Ecuación	R ²
Ecuación 4.1	1.5	$Y_{max} = 0.07US + 30.51$	0.97
Ecuación 4.2	2.0	$Y_{max} = 0.009US + 14.74$	0.99

Un incremento en el valor de Y_{\max} podría indicar que la aplicación de energía acústica es capaz de producir cambios en la pared celular, propiciando la extracción de otros polisacáridos además de pectinas y posiblemente otros componentes celulares, lo cual da lugar a la obtención de rendimientos de extracción más altos.

Se observó también que el parámetro α , tiene un comportamiento diferente en función del pH del medio. A pH 1.5, este parámetro presentó valores significativamente ($p < 0.05$) superiores en los experimentos asistidos acústicamente respecto al control; sin embargo no hubo diferencias significativas entre los experimentos realizados a las dos potencias acústicas aplicadas. Por otro lado a pH 2.0, no se observaron diferencias significativas entre los experimentos control y US1, y sin embargo, si se presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) en las condiciones US2. Según Sturzoiu & Stroescu, (2011), el parámetro α está relacionado con la inversa de la constante de velocidad (k) por lo tanto cabe esperar una mayor velocidad de extracción cuanto menor es α . Los valores obtenidos para el parámetro α no permiten extraer conclusiones claras en el presente estudio, ya que las curvas no sólo mostraron diferentes velocidades de extracción si no también, el rendimiento máximo fue diferente en cada caso.

El exponente β es un parámetro de forma característico del material y se acepta como un índice de su comportamiento durante el proceso de extracción (Sturzoiu & Stroescu, 2011). Cuando este parámetro es igual a la unidad, el modelo se corresponde a una cinética de primer orden, presentando una velocidad de extracción constante a lo largo del proceso (Eim et al., 2013). No obstante, cuando $\beta < 1$ la cinética de extracción adquiere forma convexa, presentando una velocidad que disminuye con el tiempo; y cuando $\beta > 1$, la cinética presenta una forma cóncava y la velocidad de extracción aumenta progresivamente con el tiempo (Odriozola-Serrano et al., 2008). La concavidad y convexidad de las cinéticas de extracción serán tanto más acentuadas cuanto más se aleje de la unidad el valor de β .

En todas las condiciones estudiadas, β fue menor que la unidad por lo que se entiende que la velocidad de extracción disminuyó con el tiempo. Este comportamiento de β ha sido observado en estudios previos de otros sistemas de extracción a partir de material vegetal: Sturzoiu & Stroescu (2011), quienes extrajeron β -caroteno a partir de rosa mosqueta obtuvieron los siguientes valores de $\beta = 0.37-0.64$; Quispe-Fuentes et al. (2013) quienes extrajeron saponinas a partir de pepitas de quinoa obtuvieron valores de β entre 0.21 y 0.30 y Rodríguez et al. (2014) obtuvieron valores de β entre 0.67 y 0.78 en la modelización de cinéticas de extracción de manteca de cacao, siendo todos estos, valores muy similares a los presentados en este estudio ($\beta = 0.26-0.58$). El valor de β aumentó al incrementarse la potencia acústica acercándose más a la unidad, por lo que se puede deducir que con la aplicación de energía acústica se obtienen cinéticas de extracción más rápidas. Cabe destacar que a pH 2.0, el incremento del valor de β con la potencia acústica fue sensiblemente menor que a pH 1.5.

Haciendo uso de los parámetros identificados para el modelo de Weibull, se simularon las curvas de extracción. En la Figura 4.1 y Figura 4.2 se puede observar una representación gráfica de los valores de rendimiento calculados y experimentales con su respectiva desviación estándar, para las experiencias control y las realizadas con asistencia acústica en las dos condiciones de pH. Puede observarse una buena concordancia entre los valores experimentales y los estimados mediante el modelo propuesto.

A pesar de la variabilidad experimental, principalmente atribuible a la heterogeneidad de la materia prima; se obtuvo una elevada correlación entre ambos grupos de datos, experimentales y calculados.

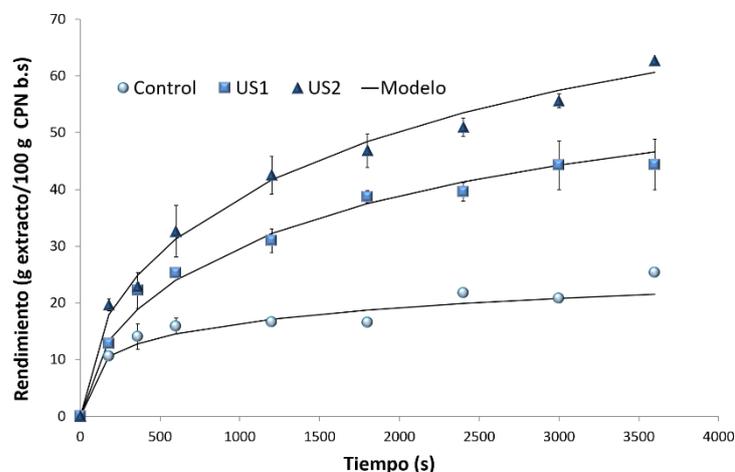


Figura 4.1: Simulación de las cinéticas de extracción a pH 1.5

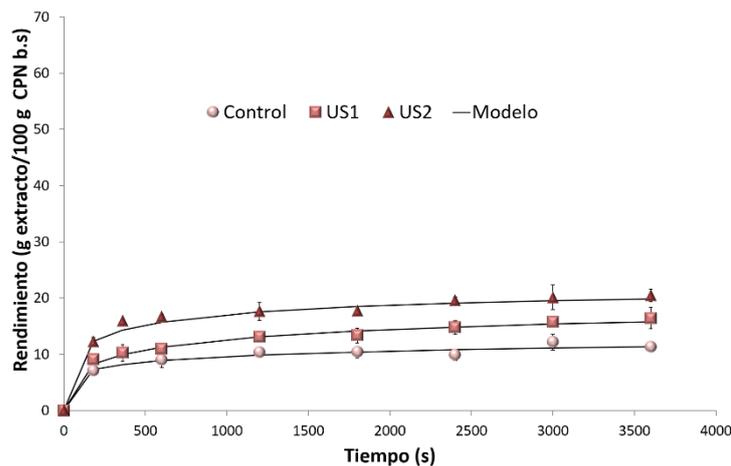


Figura 4.2: Simulación de las cinéticas de extracción a pH 2.0

Con el objeto de evaluar estadísticamente la precisión de los modelos matemáticos propuestos y, por tanto, su capacidad para representar los resultados experimentales y predecir variaciones en el sistema, se estimaron el porcentaje de error relativo medio (ERM) y el porcentaje de varianza explicada por el modelo (VAR) para las diferentes condiciones de extracción. Cuanto menor es el ERM y más cercano a 100 el porcentaje de VAR, mejor es la bondad de la simulación proporcionada por el modelo (Baş & Boyacı, 2007) (ver Tabla 4.8).

Tabla 4.8: Error relativo medio (ERM) y varianza explicada (VAR) en la comparación entre los valores experimentales y simulados

pH	Tratamiento	ERM %	VAR%
1.5	Control	7.2	91.9
	US1	5.1	98.6
	US2	4.9	99.1
2.0	Control	5.9	92.7
	US1	3.4	98.9
	US2	3.7	98.1

Tal y como puede observarse en la Tabla 4.8, los valores de ERM fueron $\leq 7.2\%$ y los porcentajes de VAR $\geq 91.7\%$, indicando la validez del modelo matemático propuesto. Atendiendo a los valores medios de ambos parámetros estadísticos, puede afirmarse que el modelo propuesto permitió simular satisfactoriamente la transferencia de materia que tuvo lugar durante el proceso de extracción.

4.5. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN EN LA COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

4.5.1. Determinación del color

Según la FAO (2009), las pectinas comerciales presentan un color blanco, amarillento, verdoso o marrón. La fibra alimentaria, y por lo tanto las pectinas, no son coloreadas en la naturaleza, sino más bien blancas. Sin embargo en las paredes vegetales se encuentran pigmentos orgánicos que pueden ser extraídos junto a las pectinas. Las frutas y vegetales de colores amarillos y naranjas suelen ser ricos en carotenoides tales como: β -carotenos, y α -carotenos; en naranjas se pueden encontrar α -criptoxantina y zeoxantina (Saini et al., 2015). Los extractos de polisacáridos obtenidos, tal y como se muestra en la Figura 4.3 presentaron diferentes tonalidades amarillas y verdes.

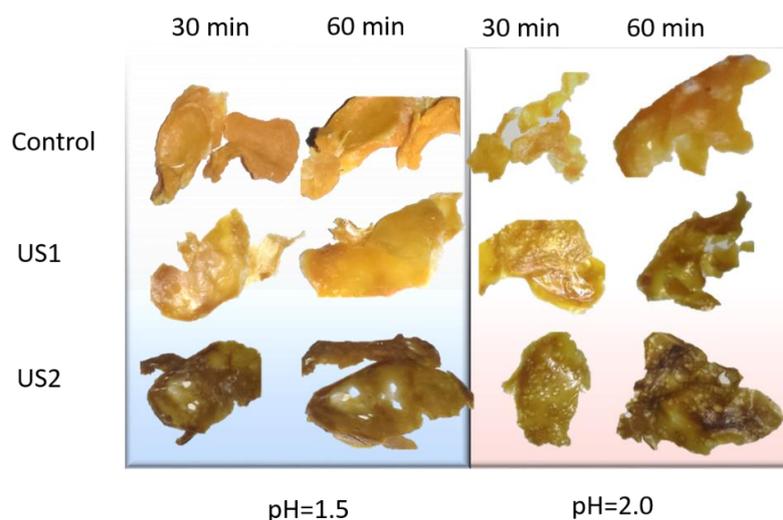


Figura 4.3: Fotografías de los extractos.

Los resultados obtenidos en la determinación física del color de los extractos, en el espacio de color CIELab*, se presenta en la Tabla 4.9. Se puede observar que los extractos más luminosos (valor superior de L*) corresponden a las muestras control es decir las muestras perdieron luminosidad con el tratamiento de extracción acústica, mientras que los valores a* y b* inferiores corresponden a los extractos obtenidos por aplicación de la potencia acústica más elevada. Los resultados del análisis estadístico aplicado demostraron que los factores que más afectan al color de los extractos son la aplicación de un tratamiento acústico y el pH del medio. La disminución en los parámetros de color fue observada también por Wang et al. (2015) en extractos de pectinas obtenidos acústicamente a partir de pomelos. Estos autores, al igual que Masmoudi et al. (2012) justificaron estos cambios en la coloración en base a la presencia de reacciones de pardeamiento de Maillard, las cuales tienen lugar fundamentalmente a temperaturas elevadas. En este trabajo, el proceso de extracción se llevó a cabo a baja temperatura (25°C) por lo que no debería esperarse este tipo de reacciones, sin embargo las

sondas de ultrasonido llegan a temperaturas muy altas y a pesar de que durante todo el experimento se controló la temperatura del sistema de extracción, es probable que en puntos más cercanos a la sonda la solución se calentará.

Se calculó la diferencia de color (ΔE) respecto al color blanco. Al comparar el ΔE de las muestras analizadas se puede observar que, en general, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre dichos valores siendo significativamente diferentes únicamente los extractos obtenidos a pH 2.0 en 60 min con condiciones control y US2.

Tabla 4.9: Parámetros de color medidos para los extractos

Tiempo (min)	pH	Tratamiento	L	a*	b*	ΔE
30	1.5	Control	53 ± 4 a	9.6 ± 0.8 a	42 ± 4 a	63 ± 5 ab
		US1	47.3 ± 0.1 abc	5.9 ± 0.6 cd	29 ± 3 bc	60 ± 3 ab
		US2	41.9 ± 0.6 cde	5.1 ± 0.3 de	22.0 ± 0.9 de	62.3 ± 0.3 ab
	2.0	Control	50 ± 2 abc	8.2 ± 0.6 b	36 ± 2 ab	62.2 ± 0.1 ab
		US1	38 ± 2 de	4.20 ± 0.01 ef	17.3 ± 0.8 ef	64 ± 2 ab
		US2	37.1 ± 0.7 e	2.0 ± 0.2 h	16 ± 2 f	65.1 ± 0.7 a
60	1.5	Control	52 ± 4 ab	7.9 ± 0.2 b	35 ± 3 ab	59 ± 5 ab
		US1	45 ± 4 bcd	5.90 ± 0.01 cd	29.2 ± 0.4 cd	62 ± 4 ab
		US2	40 ± 2 cde	3.5 ± 0.1 fg	22.0 ± 0.3 de	63 ± 2 ab
	2.0	Control	52 ± 3 ab	6.5 ± 0.6 c	30 ± 1 bc	57 ± 3 b
		US1	39 ± 2 e	2.3 ± 0.3 h	17.1 ± 0.5 f	63 ± 1 ab
		US2	35 ± 2 de	1.1 ± 0.2 gh	13.9 ± 0.7 ef	67 ± 2 a

* Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas $p < 0.05$

4.5.2. Microscopía electrónica de barrido

Con el objetivo de evaluar el efecto de los ultrasonidos de potencia sobre la microestructura de los extractos obtenidos, se observaron las muestras por microscopía electrónica de barrido. Para ello se realizaron micrografías a un aumento de 100x de los extractos de pectinas obtenidos en las diferentes condiciones estudiadas (Figura 4.4).

Como se muestra en la Figura 4.4 los extractos obtenidos por agitación mecánica, presentaron una superficie rugosa y áspera, mientras que los extraídos por aplicación de energía acústica mostraron una superficie lisa. En general, los extractos obtenidos a 30 min presentaron una estructura más compacta y rugosa que los obtenidos a 60 min, que presentaron una superficie más plana y lisa. De la misma manera, los extractos obtenidos a pH 2.0 son visiblemente más lisos y planos que los obtenidos a pH 1.5. Wang et al. (2015), observaron que las pectinas extraídas acústicamente presentaban una estructura mucho más lisa y menos compacta que las obtenidas por métodos convencionales, justificando que este hecho podía deberse a que los ultrasonidos son capaces de romper los enlaces entrecruzados entre las moléculas reorganizando la matriz péctica. Los extractos que presentaron la estructura más lisa y plana fueron los obtenidos mediante aplicación de la mayor potencia acústica (US2) (pH 2.0, 60 min).

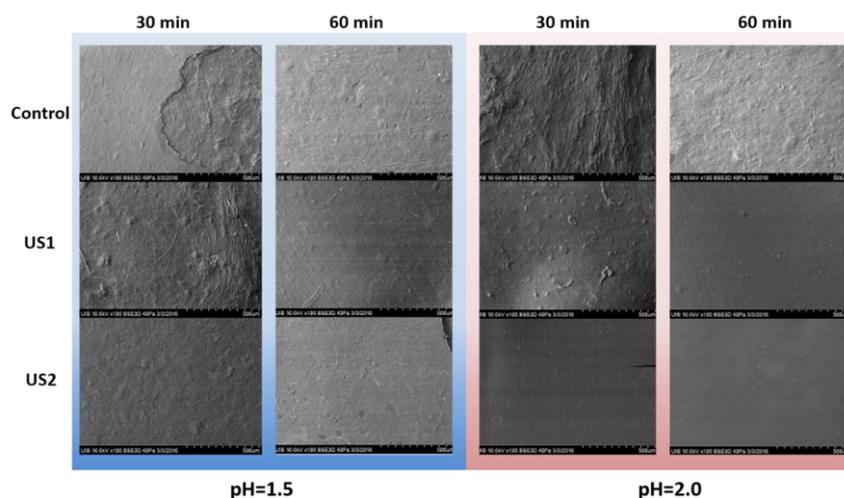


Figura 4.4: Microfotografías de los extractos.

4.5.3. Composición de monosacáridos de los extractos

El contenido de los azúcares, unidades básicas que componen las pectinas y demás polisacáridos presentes en los extractos, se muestran en la Tabla 4.10. Como puede observarse la composición en monosacáridos de los extractos varió según las condiciones de extracción; sin embargo en todos los extractos los ácidos urónicos fueron los monosacáridos más abundante. También se detectaron cantidades importantes de arabinosa, glucosa, galactosa y ramnosa en este orden, y pequeñas cantidades de xilosa y manosa. Dicho perfil de monosacáridos es similar a los reportados por Yapo et al. (2007a); Wang et al. (2015) y Wang et al. (2016b) quienes obtuvieron extractos ricos en pectinas a partir de cítricos (Tabla 4.11).

El efecto de la potencia acústica en la composición de monosacáridos, dependió del tiempo de extracción, siendo el contenido de ácidos urónicos el más afectado por la asistencia acústica. A 30 min de extracción no se observaron diferencias significativas en el contenido de ácidos urónicos de los extractos obtenidos en condiciones control y mediante la aplicación de US1 y US2. Sin embargo con un tiempo de extracción de 60 min sí se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) del contenido de los ácidos urónicos con la aplicación de ultrasonidos a pH 2.0 (61.4% molar es el contenido de la muestra extraída en condiciones control y 41.3 y 38.0% molar es el contenido de la muestra extraída con US1 y US2 respectivamente). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wang et al. (2015) y Wang et al. (2016b), quienes observaron una disminución del contenido de éste azúcar con la aplicación de energía acústica (Tabla 4.11). Estos resultados pueden justificarse en base a que tratamientos acústicos largos (60 min) puede provocar la rotura de la cadena de HG; tomando en cuenta que el contenido de ácido urónico se considera un parámetro de calidad de las pectinas, una disminución del mismo es un efecto no deseable, por lo que el tiempo de aplicación de los ultrasonidos sería un factor muy importante. Los extractos también presentaron cambios significativos en el contenido de glucosa; al aplicar energía acústica durante 30 y 60 min de extracción, se observó un aumento significativo de este azúcar a ambos pH estudiados (por ejemplo pH 2.0 y 60 min se obtuvo 13.3% molar en condiciones control y 25.6 y 24.9% molar con US1 y US2 respectivamente). Estos resultados son indicativos de que la aplicación de energía acústica posibilita la extracción de polisacáridos no pectícos que contienen glucosa en su estructura, tales como hemicelulosa y/o celulosa.

Tabla 4.10: Composición de monosacáridos de los extractos (expresadas en %molar)

Tiempo (min)	pH	Tratamiento	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA
30	1.5	Control	3.7 ± 0.1 b	0.6 ± 0.1	18 ± 2 ab	3.4 ± 0.4 abc	2.3 ± 0.2 de	4.2 ± 0.3 de	10 ± 1 g	58 ± 2 abc
		US1	3.0 ± 0.4 cde	nd	11.1 ± 0.7 d	2.3 ± 0.2 d	3.9 ± 0.2 a	3.9 ± 0.4 e	18 ± 1 cd	59 ± 3 abc
		US2	3.2 ± 0.1 bcd	nd	15 ± 1 bc	2.8 ± 0.2 cd	2.9 ± 0.2 bcd	5.5 ± 0.3 bc	16.8 ± 0.7 cdef	53 ± 2 cd
	2.0	Control	3.5 ± 0.2 bc	nd	13 ± 1 cd	2.46 ± 0.04 d	2.5 ± 0.1 cde	4.5 ± 0.4 cde	14.4 ± 0.8 defg	59 ± 1 abc
		US1	2.7 ± 0.1 de	nd	11.3 ± 0.6 d	1.2 ± 0.1 e	2.2 ± 0.2 de	4.7 ± 0.1 cde	15 ± 2 def	62 ± 2 a
		US2	2.5 ± 0.1 e	nd	12 ± 1 d	1.38 ± 0.03 e	3.3 ± 0.6 abc	4.0 ± 0.4 de	17.22 ± 0.03 cde	57 ± 5 abc
60	1.5	Control	4.4 ± 0.3 a	nd	17 ± 1 ab	3.7 ± 0.2 ab	2.2 ± 0.1 de	5.5 ± 0.3 bc	12.8 ± 0.8 fg	54.3 ± 0.9 bcd
		US1	3.03 ± 0.03 cde	nd	17 ± 1 b	3.3 ± 0.5 bc	2.6 ± 0.3 bcde	5.0 ± 0.1 cd	21 ± 2 bc	49 ± 2 de
		US2	3.3 ± 0.2 bcd	nd	16.6 ± 0.3 b	4.1 ± 0.2 a	2.7 ± 0.3 bcde	6.1 ± 0.5 ab	20 ± 1 c	47 ± 2 de
	2.0	Control	3.5 ± 0.4 bc	0.4 ± 0.1	13.2 ± 0.5 cd	2.6 ± 0.3 cd	2.0 ± 0.2 e	5.3 ± 0.1 bc	13 ± 2 efg	61 ± 4 ab
		US1	3.4 ± 0.1 bcd	nd	18 ± 1 ab	1.5 ± 0.2 e	3.4 ± 0.3 ab	7.1 ± 0.7 a	26 ± 2 a	41 ± 2 ef
		BS2	3.6 ± 0.2 bc	0.7 ± 0.1	19.8 ± 0.9 a	3.0 ± 0.3 bcd	3.3 ± 0.3 abc	6.9 ± 0.3 a	25 ± 2 ab	38 ± 3 f

* Rha: ramnosa, Fuc: fucosa, Ara: arabinosa, Xyl: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, UA: ácido urónico. nd: no detectable

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencia significativa $p < 0.05$

Tabla 4.11: Revisión bibliográfica. Composición de monosacáridos de pectinas extraídas a partir de cítricos

	Condiciones				Monosacáridos (%molar)							
	Método	T °C	Tiempo (min)	pH	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA
Pectinas extraídas de piel de frutos cítricos (Yapo, et al., 2007a)	Convencional	85	30	1.5 HCl	2.3	0.3	21.9	0.2	0.8	4.6	3.6	66.3
Pectina extraída de pomelo (Wang et al., 2015)	Asistencia acústica	67.7	56	1.5 HCl	8±1	0.9±0.3	13±3	2.7±0.4	1.0±0.3	14±2	11±1	50±1
	Convencional	80	90	1.5 HCl	7±2	0.2±0.1	4.4± 0.4	3.3±0.5	1.8±0.1	14±1	14±4	55.2±0.5
Pectina extraída de pomelo (Wang et al., 2016b)	Asistencia acústica	67	28	1.5 HCl	7.2±0.5	0.58± 0.02	14.8±0.7	3.1±0.1	2.6±0.2	11.9±0.9	3.4±0.1	56±2
	Convencional	80	90	1.5 HCl	8.3±0.7	0.8±0.1	4.0±0.2	1.3±0.4	3.0±0.2	11.5±0.1	2.8± 0.4	68.3±0.6

* Rha: ramnosa, Fuc: fucosa, Ara: arabinosa, Xyl: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, UA: ácido urónico

4.5.4. Composición de polisacáridos de los extractos

En la Figura 4.5 se representa la proporción aproximada de pectinas, celulosa y hemicelulosas de los extractos obtenidos, calculada a partir de la composición porcentual en azúcares simples de la Tabla 4.10, según las ecuaciones 3.4, 3.5 y 3.6, respectivamente.

Las pectinas fueron el componente mayoritario en todos los extractos, representando del 68 al 83%. Ello se deduce del elevado contenido en ácidos urónicos (38-61% molar) que presentaron todos los extractos, así como de la concentración intermedia de arabinosa (13-18% molar), y de la presencia, en menor medida, de galactosa (4-7% molar) y ramnosa (3-4% molar) (Tabla 4.10). La celulosa, con porcentajes comprendidos entre el 9 y el 23%, constituyó el segundo polisacárido más abundante en los extractos. Por último los heteropolímeros englobados dentro del grupo de las hemicelulosas fueron los minoritarios con porcentajes comprendidos entre el 6 y el 9%.

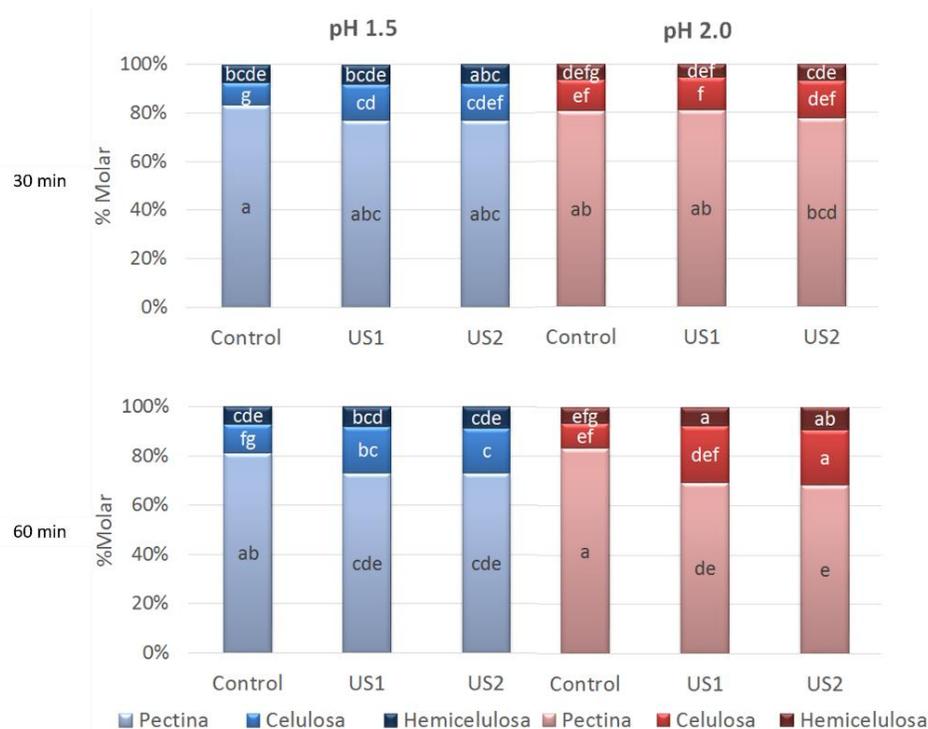


Figura 4.5: Composición en celulosa, hemicelulosa y pectinas de los extractos. Letras diferentes para un mismo polisacárido indican diferencias significativas $p < 0.05$

El efecto de la aplicación de ultrasonidos en el contenido de pectinas dependió del tiempo de extracción; cuando este fue de 30 min, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la proporción de pectinas de los extractos obtenidos en condiciones control y los obtenidos mediante asistencia acústica en ninguno de los pH estudiados (se obtuvo un porcentaje de pectinas de 83, 77 y 77% para el control US1 y US2 respectivamente, en el pH 1.5, y de 81, 81 y 78% para el pH 2.0). Mientras que cuando el tiempo de extracción fue de 60 min, la proporción de pectinas de los extractos obtenidos en condiciones control y los obtenidos mediante asistencia acústica a ambos pH estudiados (se obtuvo un porcentaje de pectinas de 81, 73 y 73% en el pH 1.5, y de 83, 69 y 68% para el pH 2.0, para el control US1 y US2, respectivamente); al comparar ambas potencias acústicas

entre sí no se obtuvieron diferencias significativas en la proporción de pectinas de los extractos. En cuanto al efecto del pH, a igualdad de condiciones de extracción, no se observó diferencias significativas con respecto al contenido de pectinas; por ejemplo en los extractos obtenidos a 30 min en condiciones control a pH 1.5 se obtuvo un contenido de pectinas de 83% y a pH 2.0 de 81% a pH 1.5.

La disminución en la proporción de pectinas en los extractos obtenidos después de 60 min mediante asistencia acústica, supuso también un aumento significativo en la proporción de celulosa y hemicelulosa, lo que podría indicar que tiempos largos de operación (60 min) suponen una ruptura de cadenas de polisacáridos no pécticos permitiéndose así su extracción en medios acuosos.

4.5.5. Estructura de las pectinas extraídas

La presencia mayoritaria de ácidos urónicos indica que las pectinas están principalmente formadas por cadenas de HG, es decir que la disolución de ácido cítrico en pH 1.5 y 2.0 es selectiva para la extracción de este tipo de cadenas; mientras que la presencia de ramnosa, arabinosa y galactosa puede indicar que contenían también cadenas laterales de RGI (Willats et al., 2006). Se calcularon tres ratios molares que permiten conocer de forma aproximada la linealidad, el contenido de cadenas laterales y la longitud de las cadenas en las pectinas extraídas mediante las ecuaciones 3.7, 3.8 y 3.9 presentadas en el apartado (3.5.5) y se presentan en la Tabla 4.12.

Los resultados del análisis estadístico realizado demostraron que el tratamiento de extracción y el tiempo fueron factores determinantes tanto en la linealidad como en la cantidad y longitud de cadenas laterales. El efecto de la aplicación de los ultrasonidos en la linealidad de las pectinas dependió del tiempo de extracción y del pH. Al comparar las pectinas extraídas con asistencia acústica durante 30 min con su respectivo control no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la linealidad, excepto un aumento significativo ($p < 0.05$) en las condiciones US1 a pH 1.5 con respecto a las condiciones control (2.0 para las condiciones control y 3.4 para US1). Por otro lado, al comparar las pectinas extraídas con asistencia acústica durante 60 min con su respectivo control no se observaron diferencias significativas cuando el pH fue 1.5; sin embargo aquellas extraídas mediante asistencia acústica a pH 2.0 presentaron una disminución muy evidente en la linealidad con respecto al control (3.1 para el control y 1.5 y 1.3 para US1 y US2 respectivamente). El efecto del pH en la linealidad de las pectinas por sí solo, no es un factor determinante ya que al comparar las pectinas extraídas en las mismas condiciones, variando únicamente el pH, en general no se observaron diferencias significativas.

Al analizar el número de cadenas laterales de las pectinas extraídas después de 30 min de proceso se observó un aumento del ratio UA/Rha con la aplicación de ultrasonidos lo que se traduce en una disminución en el número de cadenas, a un pH de extracción de 2.0 (UA/Rha = 20 para el control y 27.3 y 27.4 para US1 y US2 respectivamente); sin embargo, cuando el tiempo de extracción fue 60 min y el pH 2.0 se observó un aumento en el número de cadenas al comparar las pectinas extraídas mediante asistencia acústica con su control (UA/Rha = 21.2 para el control y 14.6 y 12.7 para US1 y US2 respectivamente). A pH 1.5 en ambos tiempos de extracción, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras control y las extraídas acústicamente.

La disminución en la linealidad de las pectinas extraídas a 60 min con ultrasonidos, coincide con los resultados reportados por Zhang et al. (2015), quienes observaron que la aplicación de energía acústica disminuyó significativamente el porcentaje molar de ácido galacturónico después de 1.5 h de tratamiento, y por lo tanto la linealidad de las pectinas. De la misma manera Wang et al. (2015) y Wang et al. (2016b) observaron un aumento en el número de cadenas y una disminución en la linealidad con la extracción asistida acústicamente. Este hecho puede deberse a dos efectos: primeramente que tiempos largos de tratamiento acústico, propician la ruptura de los enlaces entre los monómeros de ácido galacturónico; y por otro lado, la aplicación de ultrasonidos permite una mayor extracción de cadenas laterales. Ambos efectos posibilitan que la extracción acústica a tiempos largos de lugar a pectinas con una estructura más ramificada, este efecto es más evidente a pH más elevados (2.0). Aunque la bibliografía indica que la presencia de ramificaciones puede ser un factor limitante en el grado de asociación de la cadena y por lo tanto en su poder de gelificación (BeMiller, 1986); la obtención de pectinas altamente ramificadas puede resultar interesante pues algunos estudios han demostrado que pectinas formadas casi exclusivamente por cadenas laterales de RGI son capaces de reducir la proliferación celular de melanoma en ratones (Vayssade et al., 2010).

Los valores obtenidos para la longitud de las cadenas laterales son muy similares a los reportados por Kaya et al. (2014) en pectinas extraídas de piel de naranja (3.7-7.4). Tal y como se puede observar en la Tabla 4.12 no se encontraron diferencias significativas al comparar la longitud de las cadenas de las pectinas extraídas mediante asistencia acústica con su respectivo control cuando el tiempo de extracción fue de 30 min y por otro lado sí se observaron cadenas laterales significativamente más largas al comparar las pectinas extraídas mediante asistencia acústica con su control cuando el tiempo de extracción fue de 60 min tanto a pH 1.5 como 2.0 (4.9 para el control a pH 1.5 y 6.8 y 6.6 para US1 y US2 respectivamente; y 4.7 para el control a pH 2.0 y 7.2 para US1 y US2).

Tabla 4.12: Estructura de las pectinas extraídas

Tiempo (min)	pH	Tratamiento	Linealidad	Cadenas	Longitud de las cadenas
30	1.5	Control	2.0 ± 0.5 cd	18.4 ± 0.6 bcde	5.7 ± 0.4 bcde
		US1	3.4 ± 0.5 a	24 ± 4 ab	4.7 ± 0.2 de
		US2	2.2 ± 0.2 bcd	20 ± 2 bcd	6.3 ± 0.1 abc
	2.0	Control	2.8 ± 0.2 abc	20 ± 2 bcd	4.9 ± 0.5 cde
		US1	3.3 ± 0.2 a	27 ± 2 a	5.7 ± 0.3 bcde
		US2	3.1 ± 0.5 ab	27 ± 3 a	6.2 ± 0.4 abcd
60	1.5	Control	2.0 ± 0.1 cd	14 ± 1 de	4.9 ± 0.4 cde
		US1	2.0 ± 0.1 cd	19.0 ± 0.7 bcde	6.8 ± 0.3 ab
		US2	1.8 ± 0.1 d	17 ± 2 cde	6.6 ± 0.5 ab
	2.0	Control	3.1 ± 0.6 ab	21 ± 3 abc	5 ± 1 e
		US1	1.5 ± 0.1 d	15 ± 1 cde	7.2 ± 0.6 a
		US2	1.3 ± 0.1 d	12 ± 2 e	7.2 ± 0.3 a

* Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas $p < 0.05$

4.5.6. Grado de metilesterificación (GME)

Según el GME, las pectinas se dividen en dos grupos: pectinas de alto metoxilo (HMP) con GME mayor al 50% y de bajo metoxilo (LMP) con GME menor al 50% (Hosseini et al., 2016). Los resultados experimentales correspondientes al GME de las pectinas se presentan en la Figura 4.6. Los valores de GME fueron menores que los reportados en otros estudios de extracción de pectinas a temperaturas superiores a 40°C a partir de materia prima cítrica (61-77% Zanella & Taranto, 2015; 52-59% Methacanon et al., 2014); Estos valores inferiores pueden justificarse ya que Minjares-Fuentes et al., (2014) observaron que si la temperatura de extracción es elevada (superior a 40°C) se extraen pectinas con GME más altos. Resultados similares reportaron Constenla et al. (2002), quienes observaron un incremento en el GME al realizar el proceso de extracción a 80°C con respecto a 60°C. En este estudio se han extraído pectinas a temperaturas relativamente bajas (25°C) y esta podría ser la razón por la cual dichas pectinas han presentado GME más bajos a los publicados en estudios previos.

La aplicación de ultrasonidos en el proceso de extracción no afectó el GME de las pectinas ya que no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las pectinas extraídas mediante asistencia acústica y las de los experimentos de control; resultados similares fueron reportados por Wang et al. (2015), quienes no observaron diferencias significativas en el GME de pectinas extraídas mediante métodos convencionales y las extraídas mediante la aplicación de ultrasonidos.

Las pectinas extraídas a pH 1.5, en general, tuvieron un GME más elevado que las extraídas a pH 2.0 ($p < 0.05$), ($55 \pm 1\%$ en promedio para las pectinas extraídas a pH 1.5 y $46 \pm 4\%$ para las pectinas extraídas a pH 2.0). Los resultados contrastan con los reportados por Levigne et al. (2002), quienes encontraron que al aumentar el pH de extracción de 1.0 a 2.0 se obtuvieron pectinas con GME superiores a partir de la remolacha; sin embargo las condiciones de extracción fueron muy diferentes a las presentadas en este estudio; ya que utilizaron temperaturas entre 70 y 90°C y ácidos minerales (HCl ó el HNO_3).

Con respecto al tiempo de extracción, sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las pectinas extraídas a 30 y a 60 min cuando el pH de extracción fue 2.0, presentando estas GME más altos con 60 min de extracción ($50.1 \pm 0.9\%$ en promedio para 60 min y $42 \pm 2\%$ para 30 min de extracción); lo resultados coinciden con los reportados por Minjares-Fuentes et al. (2014) quienes observaron que la extracción de pectinas con un elevado GME ($> 50\%$) puede realizarse usando tiempos largos (~ 60 min) y pH elevados (~ 2.0).

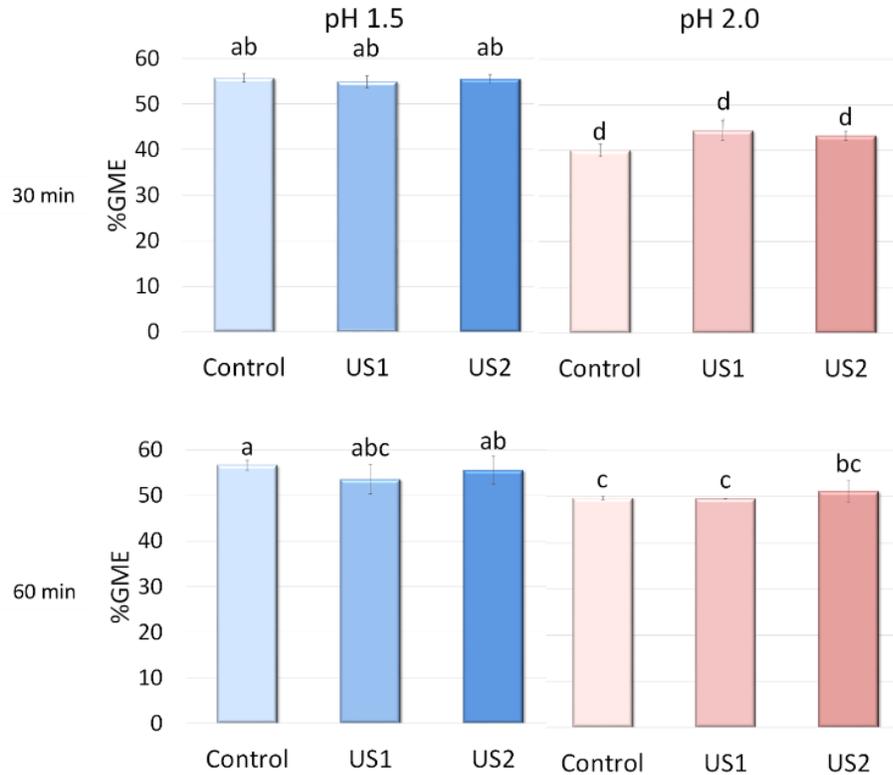


Figura 4.6: GME de las pectinas extraídas. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$

En general, se podría clasificar a las pectinas extraídas a pH 1.5 como de HMP y las extraídas a pH 2.0 como LMP. Como se mencionó en el apartado de introducción, en teoría ambas son capaces de formar geles, pero con mecanismos diferentes; las pectinas HMP forman geles en altas concentraciones de azúcar (65% o superiores) y pH bajos. Las pectinas LMP forman geles en presencia de iones calcio y no requieren de concentraciones altas de azúcar ni pH bajos; por lo tanto mientras las pectinas HMP se utilizan en la industria para la elaboración de geles dulces, mermeladas o para la estabilización de bebidas acidificadas; las pectinas LMP se utilizan para la elaboración de geles en alimentos que no contienen cantidades muy altas de azúcar, incluso para alimentos salados como salsas (Fishman et al., 2015), también son utilizadas para estabilizar bebidas lácteas incluso a elevadas temperaturas (Diah et al., 2016).

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la intensificación del proceso de extracción de pectinas de subproductos de naranja (var. *Navelina*), por aplicación de energía acústica utilizando un ácido orgánico (ácido cítrico) como disolvente. A partir de los resultados obtenidos se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- La aplicación de US de potencia, utilizando ácido cítrico como medio de extracción, demostró ser eficaz en la ruptura de las paredes celulares de los subproductos de naranja facilitando la extracción de sustancias pécticas.
- El pH del medio afectó significativamente los rendimientos de extracción, de tal manera que se obtuvieron rendimientos más elevados con el pH 1.5, por lo que se puede concluir que a este pH, se facilita la rotura de las paredes celulares.
- El incremento en los rendimientos de extracción producido por la aplicación de potencia acústica, fueron significativamente más altos a pH 1.5 que a pH 2.0 por lo que el efecto de la asistencia acústica se ve potenciado en medios más ácidos.
- Los procesos de extracción asistidos acústicamente permiten obtener rendimientos más altos y cinéticas de extracción más rápidas.
- Mediante el modelo de Weibull fue posible simular satisfactoriamente las cinéticas de extracción. Los parámetros identificados para dicho modelo indicaron que el rendimiento máximo de extracción aumentó de forma lineal en función de la potencia acústica y el parámetro β aumentó significativamente con la aplicación de ultrasonidos.
- Los extractos presentaron diferentes tonalidades de amarillo y verde y la diferencia de color con respecto al blanco no se vio afectada por la asistencia acústica, ni por el pH del medio y tampoco por el tiempo de extracción. Sin embargo la aplicación de ultrasonidos provocó una pérdida de luminosidad y una decoloración, debida probablemente a reacciones de pardeamiento de Maillard.
- Los extractos obtenidos mediante asistencia acústica presentaron una microestructura más plana y menos rugosa que aquellos obtenidos mediante agitación, consecuencia de que la aplicación de ultrasonidos pudiera provocar cambios estructurales en la matriz.
- En el perfil de monosacáridos de los extractos se obtuvo como azúcar mayoritario el ácido urónico, por lo que se puede decir que el ácido cítrico como solvente de extracción es selectivo para la obtención de cadenas de homogalacturano.
- La rotura de las paredes celulares por la aplicación de energía acústica, provocó la extracción de polisacáridos no pécticos tales como la celulosa y polisacáridos pertenecientes al grupo de las hemicelulosas. La proporción de pectinas con respecto a los demás polisacáridos disminuyó significativamente con la aplicación de ultrasonidos de potencia únicamente cuando el tiempo de extracción fue de 60 min.
- La estructura de las pectinas se vio afectada por la aplicación de ultrasonidos de potencia únicamente cuando el tiempo de extracción fue de 60 min y el pH 2.0, disminuyendo el

contenido de ácidos urónicos y por lo tanto la linealidad de las mismas, de tal forma que presentaron una estructura más ramificada.

- El grado de metilesterificación de las pectinas no se vio afectado por la aplicación de ultrasonidos de potencia, pero sí por el pH del medio de extracción. De tal forma que presentaron una disminución significativa en el grado de metilesterificación las pectinas extraídas al pH más elevado. Las pectinas extraídas a pH 2.0 presentaron GME significativamente más elevados cuando el tiempo de extracción fue más largo (60 min), por lo que se puede concluir que con pH 1.5 pueden obtenerse pectinas de alto metoxilo tanto con 30 como con 60 min de extracción, mientras que con pH 2.0 se pueden obtener pectinas de alto metoxilo con tiempos de extracción de 60 min.

Por tanto, se puede concluir que en este trabajo se ha observado un importante efecto de la aplicación de energía acústica sobre las cinéticas de extracción de pectinas, permitiendo rendimientos significativamente más altos. En cuanto a la calidad de las pectinas, los ultrasonidos no afectaron la misma en términos de contenido en azúcares pécticos, estructura y grado de metilesterificación cuando se aplicaron durante 30 min.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcon-Rojo, A. D., Janacua, H., Rodriguez, J. C., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2015). Power ultrasound in meat processing. *Meat Science*, 107, 86–93.
- AOAC (1997). Official method of analysis. Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, USA.
- Arltoft, D., Madsen, F., & Ipsen, R. (2008). Relating the microstructure of pectin and carrageenan in dairy desserts to rheological and sensory characteristics. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 660–673.
- Arnous, A., & Meyer, A. S. (2009). Quantitative Prediction of Cell Wall Polysaccharide Composition in Grape (*Vitis vinifera* L.) and Apple (*Malus domestica*) Skins from Acid Hydrolysis Monosaccharide Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3611–3619.
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410–427.
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A., & Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11-12), 1237–1243.
- Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845.
- BeMiller, J. N. (1986). An Introduction to Pectins: Structure and Properties (pp. 2–12).
- Benali, M., & Kudra, T. (2010). Process Intensification for Drying and Dewatering. *Drying Technology*, 28(10), 1127–1135.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489.
- Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., & Chemat, F. (2015). Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 72–79.
- Brett, C., & Waldron, K. (1990). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Buckeridge, M. S. (2010). Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation. *PLANT PHYSIOLOGY*, 154(3), 1017–1023.
- Bustamante, M. A., Said-Pullicino, D., Paredes, C., Cecilia, J. A., & Moral, R. (2010). Influences of winery–distillery waste compost stability and soil type on soil carbon dynamics in amended soils. *Waste Management*, 30(10), 1966–1975.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate*
- Canteri-Schemin, M. H., Fertonani, H. C. R., Waszczyński, N., & Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 259–266.
- Cárcel, J. A., García-Perez, J. V., Riera, E., & Mulet, A. (2011). Improvement of Convective Drying of Carrot by Applying Power Ultrasound—Influence of Mass Load Density. *Drying Technology*, 29(2), 174–182.
- Casas-Orozco, D., Villa, A. L., Bustamante, F., & González, L.-M. (2015). Process development and simulation of pectin extraction from orange peels. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 86–98.
- Cheung, Y.-C., Siu, K.-C., & Wu, J.-Y. (2013). Kinetic Models for Ultrasound-Assisted Extraction of Water-Soluble Components and Polysaccharides from Medicinal Fungi. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2659–2665.
- Codex Alimentarius Commission (2009). ALINORM 09/32/26. Retrieved April 15, 2016 from: www.fao.org/input/download/report/710/al32_26e.pdf.
- Constenla, D., Ponce, A. G., & Lozano, J. E. (2002). Effect of Pomace Drying on Apple Pectin. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 216–221.
- Cox, S., Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2012). Effect of different rehydration temperatures on the moisture, content of phenolic compounds, antioxidant capacity and textural properties of edible Irish brown seaweed. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 300–307.
- Crandall, P. G., Braddock, R. J., & Rouse, H. (1978). Effect of drying on pectin made from and materials &

- methods evaluation of the samples Pectin yield from leached, dried peel, 43, 1680–1682.
- Dalmau, M. E., Bornhorst, G. M., Eim, V., Rosselló, C., & Simal, S. (2017). Effects of freezing, freeze drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples. *Food Chemistry*, 215, 7–16.
- de Oliveira, C. F., Giordani, D., Gurak, P. D., Cladera-Olivera, F., & Marczak, L. D. F. (2015). Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 201–208.
- Diah, A. Vermeir L., Martins J., De Meulenaer B., P. V. der M. (2016). Improved heat stability of protein solutions and O/W emulsions upon dry heat treatment of whey protein isolate in the presence of low-methoxyl pectin.
- Diaz, J. V., Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2007). Nonenzymatic Degradation of Citrus Pectin and Pectate during Prolonged Heating: Effects of pH, Temperature, and Degree of Methyl Esterification.
- Drake, S. L., & Drake, M. A. (2011). Comparison of salty taste and time intensity of sea and land salts from around the world. *Journal of Sensory Studies*, 26(1), 25–34.
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). *EFSA Journal*, 877(83).
- Eim, V. S., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., & Bon, J. (2013). Optimisation of the addition of carrot dietary fibre to a dry fermented sausage (sobrassada) using artificial neural networks. *Meat Science*, 94(3), 341–8.
- El-Nawawi, S. a., & Shehata, F. R. (1987). Extraction of pectin from Egyptian orange peel. Factors affecting the extraction. *Biological Wastes*, 20(4), 281–290.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108–120.
- España. Ley 5/2013, de 11 de junio, por la que se modifican la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación y la Ley 22/2011 de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. [Internet], *Boletín Oficial del Estado*, 12 de junio de 2013, num. 140 pp 44257-44288 [consultado 15 de agosto 2016]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2013/06/12/pdfs/BOE-A-2013-6270.pdf>.
- Espinal-Ruiz, M., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narváez-Cuenca, C.-E., & McClements, D. J. (2016). Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*) pectins. *Food Hydrocolloids*, 52, 329–342.
- FAO, 2009. Food and Agriculture Organization Pectins – Monograph 7
- FAOSTAT. (2016). FAO Statistical Database. In). <http://www.faostat.fao.org>.
- Femenia, A., Sastre-Serrano, G., Simal, S., Garau, M. C., Eim, V. S., & Rosselló, C. (2009). Effects of air-drying temperature on the cell walls of kiwifruit processed at different stages of ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 106–112.
- Fishman, M. L., Chau, H. K., Qi, P. X., Hotchkiss, A. T., Garcia, R. A., & Cooke, P. H. (2015). Characterization of the global structure of low methoxyl pectin in solution. *Food Hydrocolloids*, 46, 153–159.
- Garau, M. C., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry*, 104(3), 1014–1024.
- González-Centeno, M. R. (2013). Tesis doctoral: Caracterización de los subproductos de la industria vitivinícola como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. Uso de los ultrasonidos de potencia para la extracción de la fracción fenólica. In, Departamento de Química. Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca (España).
- González-Centeno, M. R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., & Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506–514.
- González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1580–1586.
- Grassino, A. N., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., & Brnčić, S. R. (2016). Ultrasound assisted

- extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, 198, 93–100.
- Happi Emaga, T., Ronkart, S. N., Robert, C., Wathélet, B., & Paquot, M. (2008). Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry*, 108(2), 463–471.
- Hojnik, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2008–2016.
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., & Yarmand, M. S. (2016). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140, 59–65.
- Ibarz, A., Llorca, M., & Coll, L. (1999). Quality of industrial pectin extracted from peach pomace at different pH and temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(7), 1038–1042
- Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011). The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237–247.
- Jo.4 A. Larrauri, Pilar Rupbrez, L. B. & F. S.-C. (1996). High dietary fibre peels: associated powders from orange and lime polyphenols and antioxidant capacity. *Food Research International*.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépeau, M.-J., Sørensen, S. O., & Ralet, M.-C. (2014a). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. *Annals of Botany*, 114(6), 1319–26.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépeau, M.-J., Sørensen, S. O., & Ralet, M.-C. (2014b). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. *Annals of Botany*, 114(6), 1319–26.
- Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., & Abdul Hamid, A. (2016). Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of *Malas* variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chemistry*, 206, 156–166.
- Kitanović, S., Milenović, D., & Veljković, V. B. (2008). Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum L.*). *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), 1–11.
- Kratchanova, M., Panchev, I., Pavlova, E., & Shtereva, L. (1994). Extraction of pectin from fruit materials pretreated in an electromagnetic field of super-high frequency. *Carbohydrate Polymers*, 25(3), 141–144.
- Kulkarni S.G., & Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa L.*). *LWT - Food Science and Technology*, 43(7),
- Kurita, O., Fujiwara, T., & Yamazaki, E. (2008). Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 725–730.
- Levigne, S., Ralet, M.-C., & Thibault, J.-F. (2002). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 145–153.
- Liu, Y., Dong, M., Yang, Z., & Pan, S. (2016). Anti-diabetic effect of citrus pectin in diabetic rats and potential mechanism via PI3K/Akt signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 484–488.
- Povey, M.J.W., T. J. M. (1998). *Ultrasound in Food Processing*.
- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., & Ghouil, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 161–170.
- Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Saija, A., Dugo, G., Lo Curto, R. B. Waldron, K. W. (2006). Characterization of Flavonoids and Pectins from Bergamot (*Citrus bergamia Risso*) Peel, a Major Byproduct of Essential Oil Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 197–203.
- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T. Widmer W., et al. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*,
- Manrique, G. D., & Lajolo, F. M. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(1), 99–107.
- Maran, J. P., & Priya, B. (2015). Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 115, 732–738.
- Masmoudi, M., Besbes, S., Abbes, F., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2012). Pectin Extraction

- from Lemon By-Product with Acidified Date Juice: Effect of Extraction Conditions on Chemical Composition of Pectins. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 687–695.
- Mason, T. J., Chemat, F., & Ashokkumar, M. (2015). 27 – Power ultrasonics for food processing. In *Power Ultrasonics* (pp. 815–843).
- Maxwell, E. G., Colquhoun, I. J., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., Waldron, K. W., Morris, V. J., & Belshaw, N. J. (2016). Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains. *Carbohydrate Polymers*, 136, 923–929.
- May, C. D. (1990). Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12(1), 79–
- Methacanon, P., Krongsin, J., & Gamonpilas, C. (2014). Pomelo (*Citrus maxima*) pectin: Effects of extraction parameters and its properties. *Food Hydrocolloids*, 35, 383–391.
- Meullemiestre, A., Breil, C., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2016). Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. *Bioresource Technology*, 211, 190–199.
- Min, B., Lim, J., Ko, S., Lee, K.-G., Lee, S.-H., & Lee, S. (2011). Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Bioresource Technology*, 102(4), 3855–3860.
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., & Rosselló, C. (2014). Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: a response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, 106, 179–89.
- Mira, B., Blasco, M., Berna, A., & Subirats, S. (1999). Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 14(2), 95–104.
- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Aghlara, A., Hamid, N. S. A., Yusof, S., & Chern, B. H. (2008). Influence of pectin and CMC on physical stability, turbidity loss rate, cloudiness and flavor release of orange beverage emulsion during storage. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 83–91.
- Mohd Naeem, M. N., Mohd Fairulnizal, M. N., Norhayati, M. K., Zaiton, A., Norliza, A. H., Wan Syuriahti, W. Z., Rusidah, S. (2015). The nutritional composition of fruit jams in the Malaysian market. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Mosa, Z. M., & Kkalil, A. F. (2015). Comparative study between the effects of mango and orange peels preparations on the total dietary fiber. *IOSR Journal of Environmental Science Ver. II*, 9(11), 2319–2399.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., ... Sforza, S. (2016). Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry*, 201, 37–45.
- Odrizola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Gimeno-Añó, V., & Martín-Belloso, O. (2008). Modeling changes in health-related compounds of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 210–216.
- Panchev in, & Kirtchev, N. (1989). Kinetic model of pectin extraction. *Carbohydrate Polymers*, 11(July 1988), 193–204.
- Pérez, M. del M., Ghinea, R., Rivas, M. J., Yebra, A., Ionescu, A. M., Paravina, R. D., & Herrera, L. J. (2016). Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space. *Dental Materials*, 32(3), 461–467.
- Pinelo, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2006). Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77(1), 57–63.
- Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S., Dhulster, P., & Dimitrov, K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 137–146.
- Pradhan, A. K., Li, M., Li, Y., Kelso, L. C., Costello, T. A., & Johnson, M. G. (2012). A modified Weibull model for growth and survival of *Listeria innocua* and *Salmonella Typhimurium* in chicken breasts during refrigerated and frozen storage. *Poultry Science*, 91(6), 1482–8.
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 703–9.
- Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Lemus-Mondaca, R., Lozano, M., & Ah-Hen, K. (2013). A kinetic approach to saponin extraction during washing of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*) Seeds.

- Journal of Food Process Engineering, 36(2), 202–210.
- Rainakari, A.-I., Rita, H., Putkonen, T., & Pastell, H. (2016). New dietary fibre content results for cereals in the Nordic countries using AOAC 2011.25 method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 51, 1–8.
- Raso, J., Mañas, P., Pagán, R., & Sala, F. J. (1999). Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(4), 157–162.
- Rodríguez Barragán, O., (2014). Tesis doctoral: Intensificación de procesos de transferencia de materia mediante ultrasonidos de potencia. Aplicación al secado convectivo y a la extracción con fluidos supercríticos. In, Departamento de Química. Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca (España).
- Rodríguez, Ó., Ortuño, C., Simal, S., Benedito, J., Femenia, A., & Rosselló, C. (2014). Acoustically assisted supercritical CO₂ extraction of cocoa butter: Effects on kinetics and quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 30–37.
- Rodríguez-González, V. M., Femenia, A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Candelas-Cadillo, M. G., Rosselló, C. (2011). Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1675–1683.
- Romdhane, M. (2002). Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87(1), 11–19.
- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, 76, 735–750.
- Sant’Anna, V., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2013). Kinetic Modeling of Anthocyanin Extraction from Grape Marc. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3473–3480.
- Sareen S. Gropper, J. L. S. (2012). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*.
- Seixas, F. L., Fukuda, D. L., Turbiani, F. R. B., Garcia, P. S., Petkowicz, C. L. de O., Jagadevan, S., & Gimenes, M. L. (2014). Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) by microwave-induced heating.
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10–23.
- Sicaire, A.-G., Vian, M. A., Fine, F., Carré, P., Tostain, S., & Chemat, F. (2016). Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 319–329.
- Siles, J. A., Vargas, F., Gutiérrez, M. C., Chica, A. F., & Martín, M. A. (2016). Integral valorisation of waste orange peel using combustion, biomethanisation and co-composting technologies.
- Sivakumar, M., & Pandit, A. B. (2001). Ultrasound enhanced degradation of Rhodamine B: optimization with power density. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 233–240.
- Soliva-Fortuny, R., Bendicho-Porta, S., & Martín-Belloso, O. (2006). Modeling High-Intensity Pulsed Electric Field Inactivation of a Lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4096–4104.
- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Guzun, A.S., Dobre, T., 2011. Empirical models applied for kinetics extraction of beta-carotene from *Rosa canina*. *Revista de Chimie* 62, 344-348.
- Tummalapalli, M., Berthet, M., Verrier, B., Deopura, B. L., Alam, M. S., & Gupta, B. (2016). Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1), 234–245.
- Unión Europea. Directiva 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2006, relativa a los residuos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 27 de abril de 2006, núm 114, pp. 9.
- Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Di Scala, K., Oyanadel, R., Saavedra Torrico, J., & Miranda, M. (2011). Characteristics of Convective Drying of Pepino Fruit (*Solanum muricatum* Ait.): Application of Weibull Distribution. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1349–1356.
- Heerden V., I., Cronjé, C., Swart, S. H., & Kotzé, J. M. (2002). Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology*, 81(1), 71–76.
- Vayssade, M., Sengkhampan, N., Verhoef, R., Delaigue, C., Goundiam, O., Vigneron, P., Nagel, M.-D. (2010). Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytotherapy*

- Research : PTR, 24(7), 982–9.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161–169.
- Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D., & Mason, T. J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2), 135–139.
- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1066–1074.
- Wang, M., Fan, C., Zhao, K., Huang, B., Hu, H., Xu, X., Liu, F. (2016a). Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Wang, W., Ma, X., Jiang, P., Hu, L., Zhi, Z., Chen, J Liu, D. (2016b). Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions. *Food Hydrocolloids*, 61, 730–739.
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T.Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry*, 178, 106–14.
- Westenbrink, S., Brunt, K., & van der Kamp, J.-W. (2013). Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data. *Food Chemistry*, 140(3), 562–567.
- Willats, W. G. ., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97–104.
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014a). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72–81.
- Yapo, B. M. (2009a). Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(Dm), 1572–1578.
- Yapo, B. M. (2009b). Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource Technology*, 100(12), 3147–3151.
- Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2007a). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426–435.
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007b). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, 100(4), 1356–1364.
- Ye, J., Feng, L., Xiong, J., & Xiong, Y. (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(10), 2131–2136.
- Zanella, K., & Taranto, O. P. (2015). Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from “pera” sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *Journal of Food Engineering*, 166, 111–118.
- Zhang, L., Zhang, X., Liu, D., Ding, T., & Ye, X. (2015). Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 630–637.
- Zhang, Q., Zhang, X., Pettolino, F., Zhou, G., & Li, C. (2016a). Changes in cell wall polysaccharide composition, gene transcription and alternative splicing in germinating barley embryos. *Journal of Plant Physiology*, 191, 127–139.
- Zhang, W.-N., Zhang, H.-L., Lu, C.-Q., Luo, J.-P., & Zha, X.-Q. (2016b). A new kinetic model of ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from Chinese chive. *Food Chemistry*, 212, 274–281.
- Zhongdong, L., Guohua, W., Yunchang, G., & Kennedy, J. F. (2006). Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate Polymers*, 64(4), 548–552.
- Zhu, R.-G., Sun, Y.-D., Li, T.-P., Chen, G., Peng, X., Duan, W.-B., Jin, X.-Y. (2015). Comparative effects of hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) pectin and pectin hydrolyzates on the cholesterol homeostasis of hamsters fed high-cholesterol diets. *Chemico-Biological Interactions*, 238, 42–47.

7. ANEXOS

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido aceptados como contribución en el congreso internacional: 6th EuChemS Chemistry Congress del 11 al 15 de septiembre en Sevilla (España). A continuación se presenta, el abstract junto con la carta de aceptación, y el póster con los que se llevará a cabo esta participación.

ACOUSTIC ASSISTED EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF PECTINS FROM ORANGE PEEL

Mónica UMAÑA *, Esperanza DALMAU, Valeria EIM, Carmen ROSELLÓ; Susana SIMAL

*Department of Chemistry, University of the Balearic Islands
Ctra Valldemossa km 7.5, Palma de Mallorca, Spain 07122
Tel.:(34) 971 25 95 99, E-mail: esperanza.dalmau@uib.es*

Abstract:

Experiments of both conventional (mechanical stirring, 82 rpm) and acoustic (acoustic power densities of 542 ± 4 and 794 ± 4 W/L) extraction of pectins during 30 min in citric acid aqueous solution (at two different pHs, 1.5 and 2.0) from orange (var. *Navelina*) peel have been carried out. Pectin yields of conventional extraction were 16.5 and 10.4 g/100 g dry orange peel at pH 1.5 and 2.0, respectively. The extraction yield increased with the ultrasound application (135% and 184 % increases at pH=1.5, and 29% and 66% at pH=2.0, for the 542.3 W/L and 794.9W/L of acoustic densities, respectively, in comparison to the yields for conventional extraction), thus, the effect of the acoustic treatment was important and noticeably higher at pH 1.5. The highest yield of extraction was of 46.8 g/100 g dry orange peel, obtained at pH 1.5 and 794 W/L of acoustic density. The degree of esterification (DE) (FT-IR spectroscopic determination) and the galacturonic acid content were measured on the extracted pectins. The DE was not affected by the acoustic treatment but it was significantly higher ($p<0.05$) at pH 1.5 (55.3 ± 0.4 %) than at pH 2.0 (42 ± 2 %). The galacturonic acid content is an indicative of high quality pectins (FAO 2009). The highest figure of galacturonic acid content was obtained at pH=2.0 when extraction was acoustically assisted (66.47 mg of galacturonic acid/100 mg of total sugar with 794.9W/L). From these results, it could be concluded that acoustic assistance during pectins extraction can help to improve both the yield of extraction and also the quality of the pectins due to their DE and galacturonic acid content.

Keywords: pectin, orange peel, acoustic extraction, degree of esterification, galacturonic acid content.

Carta de aceptación



Dear Ms. Umaña,

Thank you for contribute with your poster to the 6th EuCheMS Congress in Sevilla.

Your contribution belongs to the topic B4, this code refers to the topic accepted for your abstract by Scientific Committee, please take into account it could be different than the one you selected. Your abstract will be exhibited at the Poster's Exhibition Area on Monday September 12th and Tuesday September 13th. Please take notice your poster will be displayed during two days.

Poster format must be:

Size: 1,20cm length x 0,80cm wide

We remind you it is mandatory presenting author must be registered by 15th July, 2016 in order to ensure your presentation will be included in the 6th EuCheMS Chemistry Congress programme.

Moreover we remind you that maximum one presentation is allowed per each registration.

Should you need futher information, please do not hesitate to contact us on scientific.secretariat@euchems-seville2016.eu

Kind regards,

Carlos Negro, Organizing Committee



ACOUSTIC ASSISTED EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF PECTINS FROM ORANGE PEEL

Mónica UMAÑA*, Esperanza DALMAU, Valeria EIM, Carmen ROSELLÓ, Susana SIMAL
 Dep. of Chemistry, Univ. of the Balearic Islands, Ctra. Valldemossa km. 7.5, 07122, Palma de Mallorca, Spain
 E-mail: esperanza.dalmau@uib.es

N. 1428



INTRODUCTION

In Spain, 70% of production of oranges is intended to orange juice industry, which generates about 50% by weight of residues [1]. The by-products generated in the production of juices are potential sources of bioactive compounds as polysaccharides (cellulose and pectin). The main applications of pectins due to its stabilizing and gelling properties, but the conventional methods of extraction are slow, limited and not ecofriendly.

MAIN OBJECTIVE: to evaluate the application of acoustic technology to improve the extraction of pectins from orange by-products (*var. Navelina*)

MATERIALS AND METHODS



RESULTS AND DISCUSSION

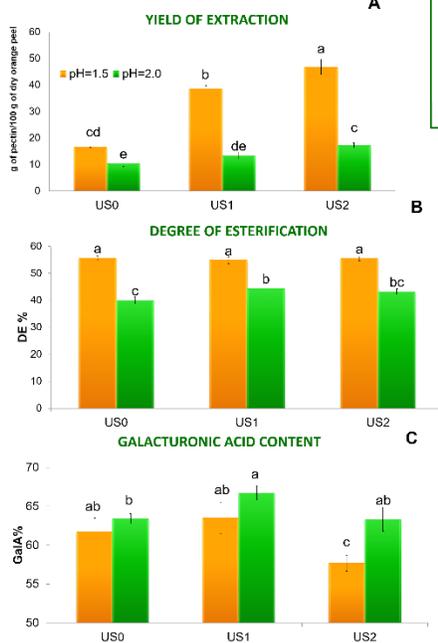


Figure 1: Comparison of yield of extraction (A), DE (B) and %GalA (C) of pectin from orange peel at pH 1.5 and 2.0 with and without acoustic assistance. Different letters indicate significant differences.

References

(1) FAO STAT. 2016 <http://faostat3.fao.org/>

Acknowledgments

The authors want to acknowledge Carolina Foundation for the scholarship, and the Balearic Government (FPI Grant and Project 57/2011) for the research fellowship (FPI/1814/2015).

CHARACTERIZATION OF PECTINS

Degree of esterification (DE)
 (FT-IR spectroscopy)
 Galacturonic acid content (GalA)
 (Colorimetric method)

The extraction yield significantly ($p < 0.05$) **increased** with the ultrasound application: 135% (US1) and 184 % (US2) increases at pH=1.5 29% (US1) and 66% (US2) increases at pH=2.0 (in comparison to the yields for agitation) **Higher** increases at pH 1.5 (Figure 1A)

DE was not affected by the acoustic treatment. DE was significantly higher ($p < 0.05$) at pH 1.5 (~55 %) than at pH 2.0 (~ 43 %) (Figure 1B)

No significant differences were observed in GalA among the different samples, being the average of 62 ± 3 % of total sugars (Figure 1C).

CONCLUSION

Acoustic assistance during pectins extraction can help to improve the yield of extraction maintaining the quality of the pectins according to their DE and galacturonic acid content.

