

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA FT-IR EN LA IDENTIFICACIÓN DE POLISACÁRIDOS OBTENIDOS DE LOS FRUTOS DEL “NÍSPERO DE LA SIERRA” Y DE LA “GRANADILLA”

N. Chasquibol S.¹

RESUMEN

Se describe la aplicación de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) para la determinación cualitativa del grado de esterificación metílica (GEM) en muestras de pectinas. El método fue empleado para la determinación cualitativa del nivel de metilación de las pectinas extraídas de los frutos del níspero de la sierra (*Nespilus sp.*) y de la granadilla (*Pasiflora ligularis*). Todas las muestras empleadas estuvieron en estado sólido. La determinación cualitativa del GEM de las muestras fueron confirmadas por FT-IR y sus espectros fueron comparados con dos pectinas estándares comerciales, empleando dos bandas características de absorbancia fuerte observadas a 1630 y 1745 cm⁻¹. Bajo condiciones experimentales estas bandas son asignadas a las frecuencias de tensión de los grupos carbonilos del ácido galacturónico y de su éster metílico, respectivamente.

Palabras clave: Espectroscopía FT-IR, pectina, grado de esterificación.

FT-IR SPECTROSCOPY FOR IDENTIFICATION OF POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM “NÍSPERO DE LA SIERRA” AND “GRANADILLA” FRUITS

ABSTRACT

Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy for determination of methyl esterification degree (MED) of pectins is described. The method was used to qualitative determination of methylation level of pectins isolated from níspero de la sierra (*Nespilus germánica*) and granadilla (*Pasiflora ligularis*) fruits. All the samples used were in solid state. Qualitative determination of MED of the samples were confirmed from FT-IR and their spectra were compared against two commercial pectin standards, using two characteristic bands of strong absorbance observed at 1630 and 1745 cm⁻¹. Under present experimental conditions these bands could be assigned to the stretching frequencies for the carbonyl groups of galacturonic acid and its methyl ester, respectively.

Keywords: FT-IR spectroscopy, pectin, degree of esterification.

1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad peruana posee una gran variedad de frutos nativos, muchos desconocidos y otros en actual investigación, que todavía no cuenta con un valor agregado en la cadena exportadora y no están siendo aprovechados comercialmente.

El “níspero de la sierra” (*Mespilus germánica*^[1]) es un árbol que crece en estado silvestre en los departamentos de Ayacucho y Junín. El fruto se caracteriza por tener una cubierta membranacea amarillo-naranja que envuelve una pulpa dura y dulce, un poco ácida y muy agradable al paladar. La cosecha

¹ Departamento de Química Analítica, Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM, nchasquibol@yahoo.es, nchasqui@ulima.edu.pe

del fruto se realiza en los meses de abril a setiembre, y entre sus usos se encuentra la preparación de dulces y mermeladas.

La granadilla (*Pasiflora ligularis*)^[2] es un fruto importante por sus características organolépticas de sabor y color, por su valor nutritivo, alto contenido de fósforo y de niacina. Tiene además propiedades medicinales, es un fruto hipoalergénico y laxante. Se puede consumir de diversas formas, como fruta fresca, jugos tropicales, cocteles, helados, yogurt, mermeladas y gelatinas.

En la época pre-inca y la Colonia, tanto en la alimentación natural, como en la medicina popular, la hoja de la granadilla se usaba para curar la erisipela, la gota, hernia, calenturas, fiebre amarilla, entre otros.

La pectina es una sustancia natural que se forma principalmente en la pared primaria y

en los tejidos mesenquimáticos y parenquimáticos de frutos y vegetales, teniendo la función de cemento intercelular^[3,4].

La pectina es esencialmente un polisacárido lineal y su composición varía según su origen y las condiciones empleadas en su separación. Parámetros como el peso molecular o el contenido de subunidades particulares difieren de molécula a molécula.

La estructura de la pectina es muy difícil de determinar debido a que la pectina puede cambiar durante la separación, almacenamiento y procesamiento de la materia prima^[5]. En la actualidad, se dice que la pectina está constituida principalmente de unidades de D-ácido galacturónico (GalA)^[6]. Estos ácidos urónicos tienen grupos carboxilos, algunos de los cuales están presentes como ésteres metílicos (Fig. 1)^[7].

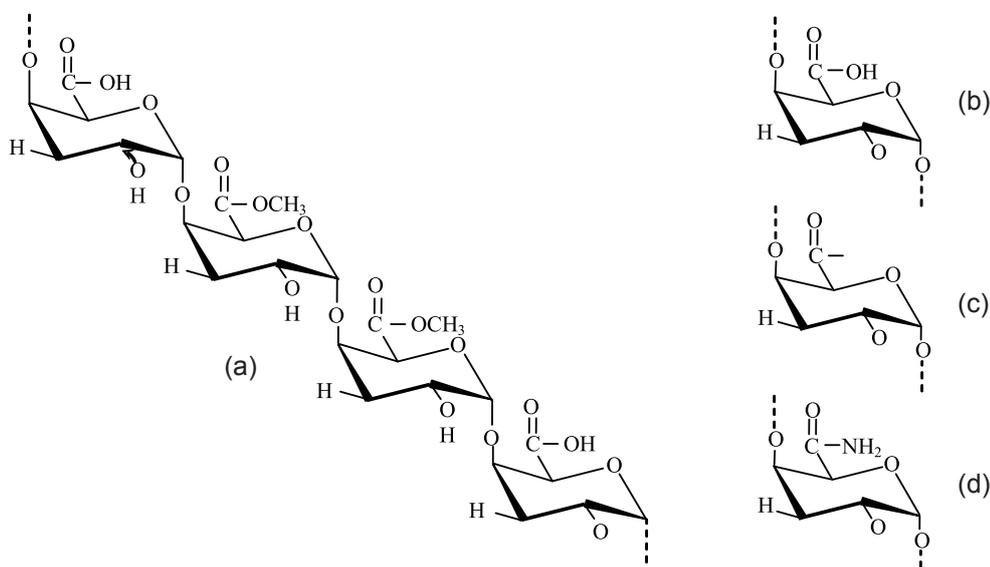


Figura 1. (a) Molécula de pectina y grupos funcionales en la cadena de la pectina, (b) grupo carboxilo, (c) grupo éster y (d) grupo amida.

Fuente: Sriamornsak, 2002^[7].

Azúcares neutros también están presentes: Rhamnosa (Rha), arabinosa, galactosa y xilosa son componentes minoritarios y se encuentran en los extremos de la cadena de la pectina^[7,8] (Fig. 2).

Las pectinas comerciales de alto metoxilo son obtenidos de cáscaras de cítricos, pulpa de manzana y betarraga^[9,10,11,12,13]. Se ha reportado también que la cáscara de la naranja contiene apreciables cantidades de pectina (25% en base seca)^[14,15].

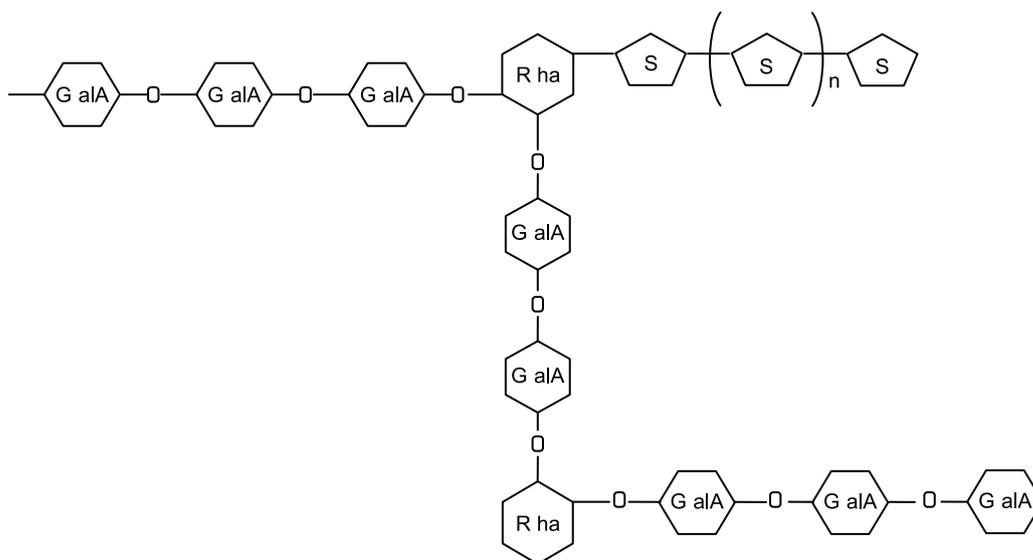


Figura 2. Inserción de rhamnosa (Rha) en la cadena del ácido galacturónico (GalA); S = azúcares neutrales.

Fuente: Sriamornsak, 2002^[7].

Los geles de pectina son importantes para crear o modificar la textura de compotas, jaleas, salsas, ketchup, mayonesas, confites, en la industria láctea para la fabricación de yogurts frutados y productos lácteos bajos en grasa; en la industria de bebidas dietéticas para la preparación de refrescos debido a su bajo contenido de carbohidrato, por sus propiedades estabilizantes y por incrementar la viscosidad.

La pectina tiene efectos beneficiosos en la salud^[16], por lo que tiene importantes aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética. En preparaciones farmacéuticas es empleada antidiarreicas, desintoxicantes y algunas drogas son encapsuladas con una película de pectina para proteger la mucosa gástrica y permitir que el componente activo se libere en la circulación de la sangre.

Además, la pectina reduce la intolerancia a la glucosa en diabéticos, baja el nivel del colesterol sanguíneo y de la fracción lipoproteica de baja densidad; así como la inhibición potencial del cáncer a la próstata y su metástasis^[17-21].

En la industria cosmética, la pectina está siendo empleada en las formulaciones de pastas dentales, ungentos, aceites, cremas, desodorantes, en tónicos capilares, lociones de baño y shampoo por sus propiedades suavizantes y estabilizantes.

Las propiedades gelificantes de las moléculas de las pectinas dependen principalmente, de su tamaño y del grado de esterificación metílica (GEM)^[22]. Por consiguiente, la determinación del GEM tiene un valor experimental importante en la investigación de

frutos durante la cosecha; así como en el área tecnológica de alimentos, cosméticos, fármacos, entre otros.

Entre los métodos que se emplean para determinar el GEM se encuentran los métodos de titulación de los grupos carboxílicos libres antes y después de la hidrólisis básica^[23], titulación con policaciones^[24], determinación del ácido galacturónico con metanol después de la saponificación^[25], entre otros.

El GEM de las pectinas puede ser determinado también por HPLC^[26] y por espectroscopia H-NMR^[27]. La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica instrumental que se emplea para caracterizar pectinas de acuerdo a su GEM^[28-31], debido a la localización de bandas de absorción originados por modos de vibración específicos de grupos de átomos en el ácido galacturónico y en el éster metílico, respectivamente.

Se estima que la producción mundial de pectina es de 35 000 toneladas por año, sus principales productores son Dinamarca, Holanda, Estados Unidos, Canadá, México, Suiza y Alemania.

Nuestro país, al igual que la gran mayoría de los países de Latinoamérica no produce pectina ni sus derivados, importándose para cubrir la demanda de la industria alimentaria y farmacéutica. De esta región sólo México ha alcanzado apropiarse del mercado mundial, exportando cerca de 5 mil toneladas al año con un importe de 45 millones de dólares. El precio promedio de pectina dentro del país es de \$ 11.97^[32].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y estándares

Todos los reactivos que se emplearon fueron de grado analítico. Las pectinas estándares

de limón y manzana fueron comprados de Sigma Aldrich.

2.2. Muestras de frutos

Los frutos de la “granadilla” y del “níspero de la sierra” fueron comprados en el mercado mayorista de frutas en la ciudad de Lima.

2.3. Obtención de la pectina

Las pectinas de los frutos del mesocarpio de la “granadilla” y de la pulpa del “níspero de la sierra” fueron obtenidas por sucesivas extracciones y purificaciones, según el proceso descrito por Chasquibol *et al.*^[37]. Las pectinas obtenidas fueron empleadas para confirmar el tipo de pectina, mediante espectrofotometría FT-IR; así como para identificar la posición y la intensidad de las bandas de los grupos funcionales más importantes.

2.4 Espectroscopía FT-IR

Todas las muestras de pectinas así como los estándares fueron secados y guardados en desecadores conteniendo silica gel previo al análisis FT-IR. Los espectros FT-IR de las muestras y de los estándares fueron registrados en el modo de transmitancia en un espectrofotómetro FT-IR, Nicolet Modelo 410, y fueron obtenidos por el método de transmisión (muestra laminada), leída directamente^[33].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Composición química y características físicas de las pectinas

La composición química y características físicas de las pectinas extraídas del mesocarpio de la “granadilla” y de la pulpa del “níspero de la sierra” se indican en la Tabla 1 y 2, respectivamente, y fueron determinados por Chasquibol, *et al.*^[34].

Tabla 1. Composición química de las pectinas extraídas de la pulpa del “níspero de la sierra” y del mesocarpio de la “granadilla”.

Composición (%)	Frutos	
	Mesocarpio de la “granadilla”	Pulpa del “níspero de la sierra”
Humedad	17,50	17,80
Cenizas	4,95	3,47
Metoxilos	14,40	14,55
Acido anhidro galacturónico (AAG)	85,99	87,93
Grado de metoxilación	88,24	89,15
Grado de esterificación	88,79	86,24
Sodio	*	0,40
Potasio	*	1,83
Calcio	*	0,94

*Por identificarse
Elaboración propia

Tabla 2. Características físicas de las pectinas extraídas de la pulpa del “níspero de la sierra” y del mesocarpio de la “granadilla”.

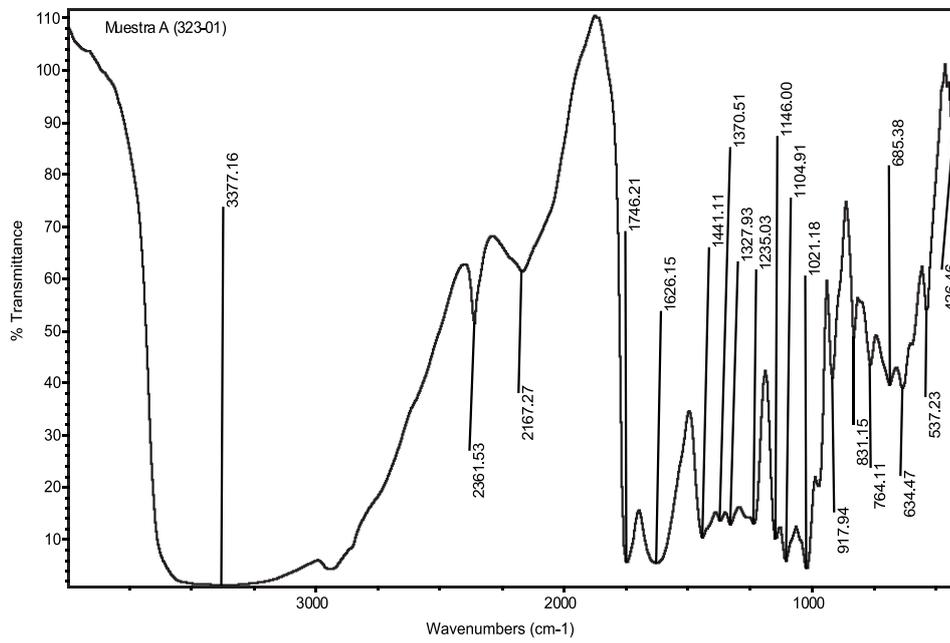
Características físicas	Frutos	
	Mesocarpio de la “granadilla”	Pulpa del “níspero de la sierra”
Grado de gelificación	260	200
Viscosidad relativa	1,85	1,49
Viscosidad intrínseca	6,5	4,25
Peso molecular	16366,96	10183,5

Elaboración propia

3.2. Espectroscopía FT-IR

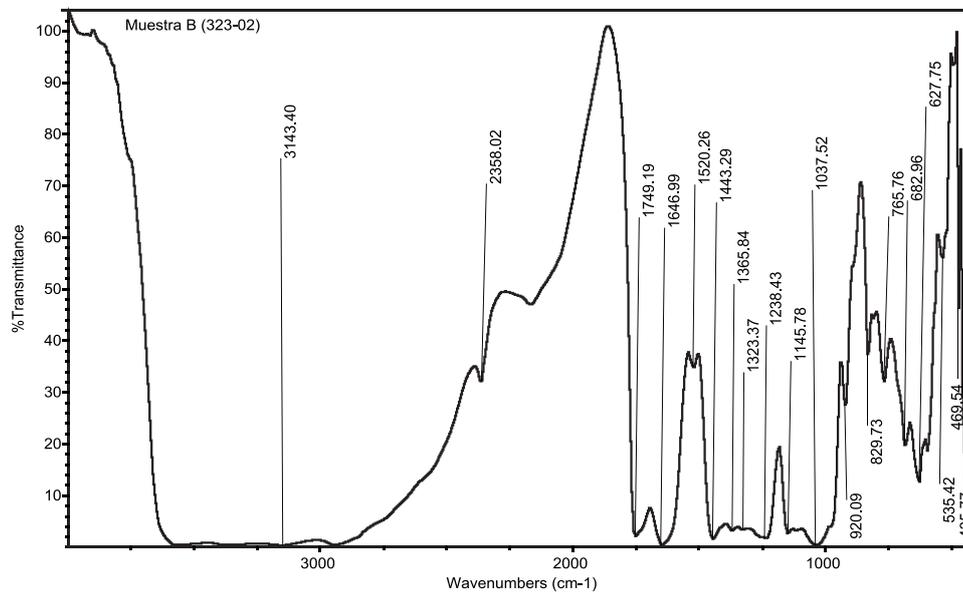
Los espectros FT-IR de las pectinas obtenidas por el proceso de extracción con HCl del mesocarpio de la “granadilla” y de la

pulpa del “níspero de la sierra” se indican en las Figuras 1 y 2. En las Figuras 3 y 4, se registran también los espectros de las pectinas comerciales estándares de limón y de manzana.



Elaboración propia.

Figura 1. Espectro FT-IR de la pectina del mesocarpio de la "granadilla".



Elaboración propia

Figura 2. Espectro FT- IR de la pectina de la pulpa del "níspero de la sierra".

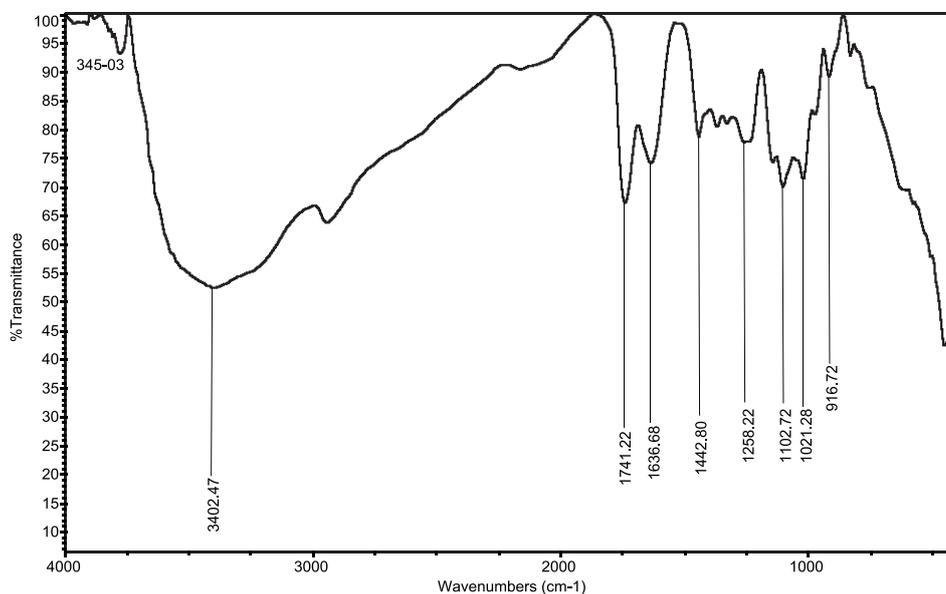
Los espectros FT-IR de las muestras de pectinas (Figs. 1 y 2) y de los estándares (Figs. 3 y 4); indican que la banda ancha de absorción común cercano a 3400 cm^{-1} fue debido a las vibraciones de tensión del O-H; lo cual confirma que existen muchos grupos OH en la molécula de las pectinas.

Las bandas de particular importancia son aquellas que presentan un par de bandas características de intensidad fuerte entre 1630 y 1745 cm^{-1} , las cuales indican la absorción fuerte de grupos carboxilos libres y esterificados. Estas bandas son útiles para determinar el grado de esterificación metílica (GEM); así como también para la identificación de pectinas de “alto” o “bajo” metoxilo^[38].

Los espectros FT-IR de las muestras de pectinas (Figs. 1 y 2) y de los estándares (Figs. 3 y 4), presentan características similares; ya que mostraron el par de bandas características. La primera banda presen-

ta vibraciones de intensidad fuerte entre 1740 - 1749 cm^{-1} y que fueron atribuidos a las bandas de vibración de tensión de los grupos carbonílicos (C=O) presentes en los grupos COOH y en los grupos COOCH₃ de la pectina. La segunda banda característica de vibración de tensión simétrica del grupo COO⁻ y de intensidad fuerte apareció entre 1626 - 1648 cm^{-1} , respectivamente^[39,40].

La comparación cualitativa de las longitudes de onda de estas dos bandas características, que se incrementaron con el aumento en el grado de esterificación, en contraste con la disminución en la intensidad de las bandas de tensión del ion carboxilo libre^[35,36,38], confirmaron el alto grado de esterificación metílica (GEM) y la presencia de pectinas de “alto metoxilo” en el mesocarpio de la “granadilla” y en la pulpa del “níspero de la sierra”, respectivamente, confirmando el análisis derivado de los resultados mostrados en las Tablas 1 y 2, respectivamente^[37].

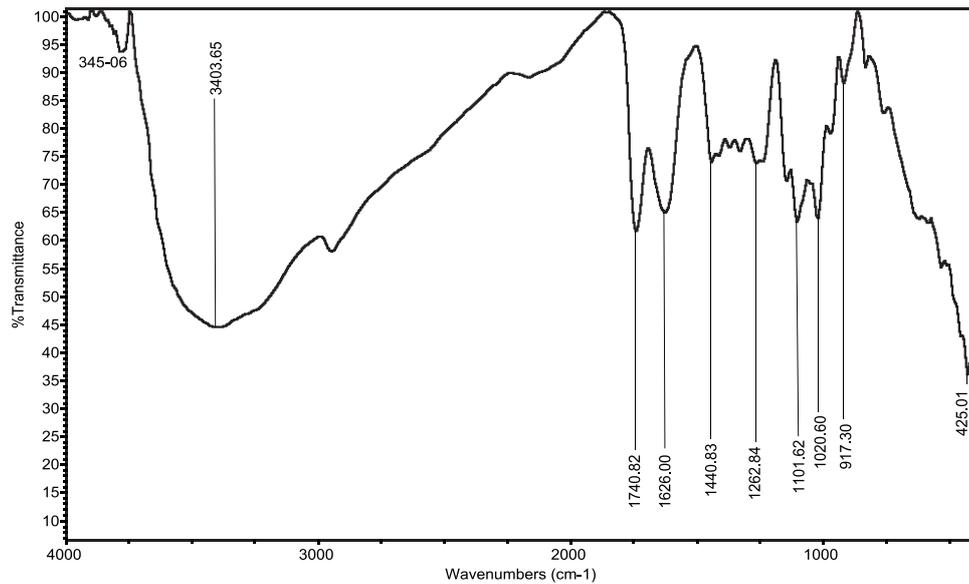


Elaboración propia

Figura 3. Espectro FT-IR de la pectina estándar de “manzana”.

Los picos entre 1370 - 1443 cm^{-1} y 1327 - 11365 cm^{-1} corresponden a la banda de

vibración de flexión en el plano del grupo C—O—H.



Elaboración propia.

Figura 4. Espectro FT-IR de la pectina estándar de “limón”.

Los picos entre 1235 y 1238 cm^{-1} corresponden a la banda de vibración de tensión asimétrica del C—O—C, e indica la abundancia de los grupos metoxilos (—O—CH₃). El pico fuerte entre 1021 y 1037 cm^{-1} indica la banda de vibración de tensión del grupo simétrico C—O—C, lo cual confirma también el alto grado de esterificación (GEM) y la presencia de pectinas de “alto metoxilo” en las pectinas estudiadas.

4. CONCLUSIONES

Los espectros FT-IR del mesocarpio de la “granadilla” y de la pulpa del “níspero de la sierra” presentan similares patrones de absorción que las pectinas estándares comerciales, confirmando que los polisacáridos extraídos de ambos frutos son pectinas con alto grado de esterificación metílica (GEM) y de “alto metoxilo”.

Las pectinas del mesocarpio de la “granadilla” y de la pulpa del “níspero de la sierra” tienen un gran potencial comercial como hidrocoloide en la industria de alimentos y el proceso de extracción es un proceso fácil para ser aplicada a escala industrial

El presente artículo reporta las propiedades químicas y físicas de estos dos nuevos materiales con muchas aplicaciones, aumentando la cadena de valor en la creación de nuevos productos para el mercado interno y para la agroexportación.

5. AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ingeniería Industrial y al Instituto de Investigación Científica de la Universidad de Lima (IDIC) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Chasquibol S.N. Estudio y cuantificación de carotenoides por métodos espectroscópicos del fruto del níspero de la sierra y su valoración como alimento funcional. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química de la UNMSM*, 2006; Volumen 9, número 1
- [2] Malca G. O. Granadilla, extracto y fresco. Facultad de Administración y Contabilidad. Universidad del Pacífico, 2001:1-58

- [3] Nwanekesi, E.O. Alawuba y C. Mkpolulu. Characterization of Pectic substances from select tropical fruits. *J.Sci. Technol.* 1994;31 (2): 159-161.
- [4] Srinrangarajan, A. y A. Shrikhande. Technical note: Comparative aspects of pectin extracted from the peels of different varieties of mango. *J. Food Technol.* 1979;14: 567-569.
- [5] Novosel'skaya, I.L., *et al.* Trends in the science and applications of pectins. *Chemistry of Natural Compounds*, 2000: 36, pp. 1-10.
- [6] Mukhiddinov, Z.K., *et al.* Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan. *Talanta*, 2000: 53, pp. 171-176.
- [7] Sriamornsak, P. Analysis of selected physicochemical properties of pectin and alginate gels intended for drug delivery. PhD Thesis, Charles Sturt University, 2002.
- [8] Oakenfull, D.G. The chemistry of high-methoxyl pectins. In *The chemistry and technology of pectin*. 1991. ed. R.H. Walter (New York: Academic Press).
- [9] Cohen E., Sharon, R., Volman L., Hoening, R., & Saguy, I. (1984), Characteristics of Israeli citrus peel and citrus juice. *Journal of Food Science*, 49 (4), 987-990.
- [10] Ma. E., Cervera, Q., Sánchez, M., & Gaspar, M. (1993). Integrated utilization of orange peel. *Bioresource technology*, 44 (1), 61-63.
- [11] Arslan, N., & Togrul, H. (1996). Filtration of pectin extract from grapefruit peel and viscosity of pectin solutions. *Journal of Food Engineering*, 27 (2), 191-201.
- [12] El-Nawawi, S.A., & Heikal, Y.A. (1996). Production of pectin pomace and recovery of leach liquids from orange peel. *Journal of Food Engineering*, 28, 341-347.
- [13] Arslan, N., & Kar, F. (1998). Filtration of sugar-beet pulp pectin extract and flow properties of pectin solutions. *Journal of Food Engineering*, 31 (1), 113-122.
- [14] Akhtar N., & Uddin M. (1971). Fractionation of pectins. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 14 (4/5), 346-349.
- [15] Gregory, D. J. H. (1986). In G.G. Birsc & M.G. Lindley (eds). *Interactions of Food Components*, (pp. 211-240), London: Elsevier.
- [16] Addosio R., Paéz G., Marín M., Már-mol Z., Ferrer J. (2005). Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 22: 240-249.
- [17] Sharma S. K., Liptay A., Moguer M. L (1998). Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. *Food Research international*, Vol. 30, N.º 7, pp. 543-547.
- [18] Boonrad D., Reanma K., Niamsup H. (2006) Extraction and phisicoquematical characteristics of acid soluble pectin from raw papaya (*carica papaya*) peel. *Chiang Mai J. Sci*, 33 (1): 129-135.
- [19] Villarreal F. R., Arellano P., & Moreno J. (1963): Estudio químico sobre seis especies de nopales (*Opuntia spp*). *Ciencia Mexicana*, 22, 59-65.
- [20] Goycoolea F.M. Cárdenas A., Rinaudo M. (2008) On the gelling behaviour of "nopal" (*Opuntia Picus indica*) low methoxyl pectin, Carbohydrate Polymers, article in press.
- [21] Yamada H: Contributions of pectins on health care, Pectins and pectinases: proceedings of an international symposium, Wageningen, The Netherlands, December 3-7, 1995. Edited by Visser J, Voragen AGJ. Amsterdam, Elsevier, 1996, pp. 173-90.
- [22] Heitman DW, Hardman WE, Cameron IL (1992). Dietary supplementation with pectin and guar gum on 1,2-dimetilhi-

- drazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*; 13: 815-8.
- [23] Platt D, Raz A: Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute* 1992; 84: 438-42
- [24] Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A: Inhibition of human cancer cell growth metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *Journal of National Cancer Institute* 2002; 94: 1854-62.
- [25] Inohara H, Raz A. Effects of natural complex carbohydrates (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3-funtions. *Glyconjugates Journal*, 1994; 11: 527-32.
- [26] Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS, Lehr J, Donat TL, Tait L, Hogan V, Raz A: Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *Journal of National Cancer Institute* 1995; 87: 348-53.
- [27] Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K. Chemistry and uses of pectin, areview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 1997; 37, 47-73.
- [28] Schultz, R.W. *Methods of Carbohydrate Chemistry*, 1965: vol. 5, pp. 189-194.
- [29] Knee, M. properties of polygalacturonate and cell cohesion in apple fruit cortical tissue. *Phytochemistry* 1978: 17,1257-1260.
- [30] Filiserri-Cozzi, Carpita N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Bioch.* 1991: 91, 157-162
- [31] Ploger, A. Conductivity detection of pectin. A rapid HPLC method to analyze degree of esterificación. *J. Food Sci*, 1992: 57, 1185-1186
- [32] Grasdalen, H., Bakoy, O.E., Larsen, B. Detrmination of the degree of sterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 1988: 184, 183-191.
- [33] Mc Cann. M.C., Chen, L. Toberts., Kemsley, E.K, Sene. C, Carpita, N.C., Stacey, N.J., Wilson, R.H. Infrared microspectroscopy: sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Physiol. Plant*, 1997: 100, 129-738.
- [34] Reintjes, M. Musco, D.D., Joseph. G.H. Infrared spectra of some pectic usbtances. *J. Food. Sci*, 1962: 27, 441-445.
- [35] Filippov, M.P., Kohn, R. Determination of the esterification degree of carboxyl groups of pectin with metanol by means of infrared spectroscopy. *Chem. Zvesti* 1975: 29, 88-91.
- [36] Chatjigakis, A.K. Pappas, C. Proxenia, N., Kalanatzi, O. Rodis, P., Polissiou, M. FT-IR spectroscopic determination of the degree esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydr. Polym*, 1998: 37, 395-408.
- [37] Chasquibol, S. N, Arroyo, B. E, Morales G. J. Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad de Lima, Fondo Editorial Año X, N.º 26, 2008: 175-199.*
- [38] Manrique G.D, Lajolo F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 25: 99-107.
- [39] Kamnev, A.A., Colina, M., Rodriguez, J., Ptitchkina, N.M., & Ignatov, V.V. Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources. *Food Hydrocolloids*, 1998: 12, 263-271.
- [40] Silverstein, R.M., Bassler, G.C., & Morrill, T.C. *Spectrometric identification of organic compounds*, 1991: New York: Wiley.