

NOTA TÉCNICA

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA CUANTIFICAR SUSTANCIAS PÉCTICAS EN PARCHITA (*Passiflora edulis*)

Humberto Barazarte¹, Tonny García¹, Elba Garrido¹, Hilda Pérez¹ y Yanira Terán¹

RESUMEN

El análisis rutinario de pectinas en productos vegetales requiere de técnicas cuantitativas rápidas y precisas. Por tal motivo, se evaluó la exactitud y precisión de los métodos carbazol y m-hidroxifenilfenol en la cuantificación del contenido péctico en cáscara de parchita. Se determinó el porcentaje de recuperación de ácido galacturónico (AGA) y coeficiente de variación (CV) a muestras deshidratadas con adición de cantidades variables de pectina comercial y se cuantificó el contenido de AGA utilizando los métodos antes señalados. Con el método del carbazol se obtuvo recuperación de AGA de 90,74 a 102,18 % y coeficiente de variación (CV) de 0,80 a 3,44 %, mientras que con el método del m-hidroxifenilfenol la recuperación fue de 85,01 a 107,9 % de AGA y CV de 2,74 a 5,98 %, lo que refleja baja dispersión y poco efecto de sustancias interferentes. En cáscara de parchita se obtuvo de 15,81 a 17,0 % de AGA en base seca. De acuerdo con la sencillez, reproducibilidad y mínimo efecto de compuestos interferentes, se concluye que los métodos colorimétricos del carbazol y del m-hidroxifenilfenol son útiles en la determinación de sustancias pécticas en cáscara de frutos como la parchita.

Palabras clave adicionales: Carbazol, m-hidroxifenilfenol, ácido galacturónico, pectina

ABSTRACT

Evaluation of two colorimetric methods for quantification of pectic substances in passion fruit (*Passiflora edulis*)

The routine analysis of pectins in vegetal products requires fast and precise quantitative techniques. By such a reason, the accuracy and precision of the carbazole and m-hydroxydiphenyl methods for quantification of pectin content in passion fruit rind was evaluated. The galacturonic acid (GA) recovery was determined in dehydrated samples with addition of varying amounts of commercial pectin, and the rind GA content was quantified using the mentioned methods. With the carbazole method, recovery from 90.74 to 102.18 % and coefficient of variation (CV) from 0.80 to 3.44 % was obtained, while with the m-hydroxydiphenyl method the recovery was from 85.01 to 107.9 % and CV from 2.74 to 5.98 %, reflecting low dispersion and little effect of interfering substances. In passion fruit rind from 15.81 to 17.0 % of GA on a dry matter basis was obtained. Based on simplicity, reproducibility and minimal effect of interfering compounds, the carbazole and m-hydroxydiphenyl methods are useful for determination of pectic substances in fruits, like passion fruit.

Additional key words: Carbazole, m-hydroxydiphenyl, galacturonic acid, pectin

INTRODUCCIÓN

Las pectinas representan un grupo de heteropolisacáridos formados principalmente por polímeros lineales de ácido galacturónico, presentes en los tejidos vegetales, donde funcionan como agente hidratante y material cementante de la red de celulosa (Cheftel y Cheftel, 1976; Thakur et al., 1997). Las pectinas afectan la textura de los vegetales y sus derivados

y son usadas como gelificantes y espesantes en la industria alimentaria (Willats et al., 2006).

La determinación del contenido péctico en alimentos presenta dificultades derivadas de la estructura de la molécula de pectina (Ibarz et al., 2006). La matriz vegetal suele contener grandes cantidades de almidón, azúcares, celulosa y otros carbohidratos asociados a la pectina que interfieren con su determinación analítica (Kitner y Van Buren, 1982). Esto representa un problema en los análisis

Recibido: Febrero 5, 2009

Aceptado: Abril 1, 2010

¹ Dpto. de Ecología y Control de Calidad, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: humbara73@gmail.com; tonnygarcia@ucla.edu.ve; egarri@ucla.edu.ve; pisvalle@yahoo.com

de rutina, donde se requiere que las técnicas sean rápidas y precisas (Ibarz et al., 2006).

La metodología para cuantificar pectinas en materiales vegetales implica una etapa previa de extracción y purificación y la determinación final se realiza con diferentes técnicas, siendo los métodos colorimétricos los más usados debido a su mayor selectividad con respecto a los volumétricos y gravimétricos, y su mayor sencillez en relación a las técnicas cromatográficas y electroforéticas (Carbonell et al., 1990).

Se conocen varios métodos colorimétricos para la cuantificación de sustancias pécticas, entre ellos los métodos del carbazol (McCready y McComb, 1952) y del m-hidroxifenilfenol (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973). Estas técnicas se fundamentan en la reacción del ácido 5-formil-2 furancarboxílico, procedente de la acción en caliente del ácido sulfúrico sobre el ácido galacturónico, con un reactivo colorimétrico para obtener un producto coloreado que se absorbe a una determinada longitud de onda máxima (Ros et al., 1992). Barazarte et al. (2007) encontraron que ambos métodos reproducen bastante bien los valores de ácido anhidrogalacturónico al comparar medidas experimentales con los patrones correspondientes.

El método del carbazol ha sido el más difundido como análisis de rutina (Visciglio y San Juan, 2000). Sin embargo, trabajos recientes prefieren el método del m-hidroxifenilfenol por su mayor sensibilidad y especificidad en presencia de azúcares y componentes fenólicos (Ibarz et al., 2006). Indiferentemente de la técnica aplicada, la estructura altamente compleja y heterogénea de las pectinas exige selectividad y exactitud del método analítico de cuantificación (Carbonell et al., 1989; Rodríguez et al., 1992; Willats et al., 2006).

El objetivo del estudio fue evaluar la exactitud y precisión de los métodos colorimétricos del carbazol y del m-hidroxifenilfenol en la cuantificación del contenido péctico de la cáscara de parchita, una potencial fuente de pectina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron frutos de parchita (*Passiflora edulis*) en dos estados de maduración, amarillo y verde-amarillo, procedentes del Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. Los frutos se cortaron en dos mitades y se descartó el endocarpio (pulpa). Las cáscaras (exocarpio + mesocarpio) se lavaron

con agua, se cortaron en trozos que se liofilizaron y molieron hasta granulometría de 60 mallas. La harina obtenida se almacenó en envases herméticos de vidrio a temperatura ambiente.

La evaluación de los métodos se realizó por adición de cantidades conocidas de pectina a la cáscara deshidratada y molida para luego medir experimentalmente la proporción del analito adicionado, lo que permite determinar efectos de compuestos interferentes presentes en la muestra (Rodríguez et al., 1992). Para ello, se pesó 1,0 g de la harina obtenida y se adicionaron tres cantidades diferentes (0,05; 0,10 y 0,15 g) de pectina comercial de cítrico (Sigma P9135). Se realizaron seis repeticiones por cada uno de los tres tratamientos.

Se realizó la extracción de sustancias pécticas según McCready y McComb (1952), para lo cual se lavaron los azúcares con etanol al 95 y 70 %, se adicionaron 200 mL de EDTA 0,5 %, se llevó a pH 11,5 con NaOH 1N y se mantuvo 30 min. Luego se llevó a pH 5,0-5,5 con ácido acético 1N, se añadieron 0,05 g de pectinasa (*Aspergillus niger*; 1,0 U·mg⁻¹) y se almacenó a 0 °C. Después de diluir y filtrar se determinó el contenido de AGA mediante el desarrollo de una reacción colorimétrica utilizando los compuestos carbazol (McCready y McComb, 1952) o m-hidroxifenilfenol (Carbonell et al., 1989). La curva de calibración (Figura 1) se elaboró para cada método bajo estudio a partir de una solución patrón de AGA de 100 µg·mL⁻¹, preparada con ácido D (+) anhidrogalacturónico monohidratado.

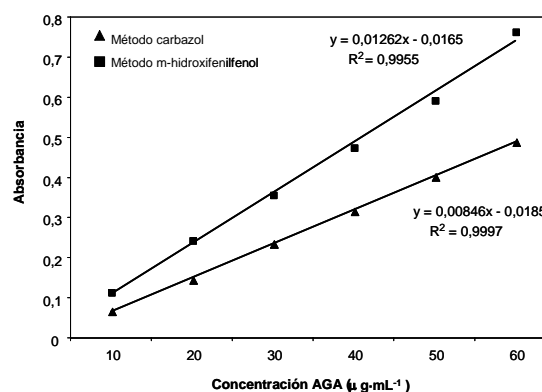


Figura 1. Curvas de calibración de los métodos del carbazol y del m-hidroxifenilfenol

La exactitud y precisión se estimaron en función del porcentaje de recuperación y coeficiente de variación, respectivamente. Para el

cálculo del porcentaje de recuperación se obtuvo la diferencia experimental de contenido de AGA entre pares de muestras con divergencia en 0,05 g de pectina añadida y se relacionó con el contenido de AGA (73,4 %) correspondiente de la pectina comercial, tal como se expresa en la ecuación (Carbonell et al., 1989):

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Diferencia experimental (g)}}{0,05 \text{ g} \cdot 0,734} \cdot 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La baja dispersión de los resultados al aplicar los métodos del carbazol e m-hidroxifenilfenol (Cuadro 1), reflejado en bajos CV, indica una buena precisión de ambos métodos. También se observan buenos valores de recuperación

(exactitud) considerando que son técnicas sencillas y rápidas. Esto indica que las metodologías eliminan en buena medida el efecto de compuestos interferentes, por lo que son confiables para la determinación de pectina en la cáscara de parchita. Estos resultados son comparables a los hallados por Meseguer et al. (1998) quienes dan valores de recuperación de ácido galacturónico en muestras vegetales entre 82 y 95 % con CV entre 1,75 y 4,63 %, con el método del m-hidroxifenilfenol. Mediante este método, Carbonell et al. (1989) encontraron un valor de recuperación de 104,6 ± 12,2 % y CV entre 0,9 y 6,4 % en la determinación de pectina comercial en mermeladas, y Rodríguez et al. (1992) obtuvieron en nabo recuperación de ácido péctico entre 91,15 y 95,28 % y CV de 1,06 a 3,4 %.

Cuadro 1. Contenido de ácido galacturónico en muestras de cáscara de parchita con adición de pectina comercial, y porcentaje de recuperación al determinarlo por dos métodos

Muestra	Pectina añadida (g·g muestra ⁻¹)	Método del carbazol				Método del m-hidroxifenilfenol			
		AGA* (g·g muestra ⁻¹)	CV (%)	Diferencia **	% R	AGA* (g·g muestra ⁻¹)	CV (%)	Diferencia **	% R
A	0,05	0,2029	0,80			0,1806	5,39		
A	0,10	0,2370	2,13	0,0341	92,92	0,2202	5,63	0,0396	107,90
A	0,15	0,2703	1,02	0,0333	90,74	0,2560	2,74	0,0358	97,55
VA	0,05	0,1982	3,44			0,1812	3,39		
VA	0,10	0,2315	1,07	0,0333	90,74	0,2174	4,06	0,0362	98,64
VA	0,15	0,2690	1,14	0,0375	102,18	0,2486	5,98	0,0312	85,01

*Promedio de 6 réplicas. **Diferencia del contenido de AGA entre muestras con divergencia de 0,05 g de pectina comercial. A: cáscara de parchita amarilla; VA: cáscara de parchita verde-amarilla; AGA: ácido galacturónico. % R: porcentaje de recuperación

Se observó que el valor de absorbancia alcanzado a los 20 minutos después de adicionar el reactivo m-hidroxifenilfenol, disminuyó 3,95 y 8,6 % al transcurrir 1 y 2 horas, respectivamente. Esta situación sugiere que 20 minutos después de la reacción colorimétrica, la absorbancia disminuye con el tiempo, originando errores en la lectura al utilizar series de seis tubos de muestra. Resultados similares fueron encontrados por Ibarz et al. (2006) con el método del m-hidroxifenilfenol, quienes afirman que la absorbancia de la muestra alcanza un valor máximo dependiente de la concentración de AGA, que luego disminuye rápidamente, por lo que recomiendan manipular cada tubo de muestra en forma individual al adicionar el reactivo colorimétrico para registrar el valor máximo de absorbancia y disminuir así

errores de exactitud y precisión.

Los valores de AGA obtenidos con el método del carbazol tendieron a ser más altos a los encontrados con el método del m-hidroxifenilfenol (Cuadro 2); sin embargo, en los dos casos los valores tienen cierta concordancia con los resultados de Yapó y Koffi (2006) quienes determinaron 19,1 % de AGA en cáscaras de parchita en estado de maduración verde. Además, se destaca que el contenido de AGA tendió a ser menor en cáscara amarilla en relación a la verde-amarilla, comportamiento que se explica por la degradación de la protopectina durante la maduración. Los resultados demuestran la confiabilidad de ambos métodos que, unido a la sencillez y rapidez, originan dos técnicas útiles para la cuantificación de sustancias pécticas en la

cáscara de frutos como la parchita.

Cuadro 2. Contenido promedio de AGA (g por cada 100 g de muestra seca) de la cáscara de parchita determinado por dos métodos

Muestra	Carbazol*	m-hidroxifenilfenol*
Cáscara amarilla	16,21 ± 0,53	15,81 ± 0,60
Cáscara verde-amarilla	17,00 ± 0,20	16,50 ± 0,62

*Resultados expresados como media y desviación estándar de seis réplicas

CONCLUSIONES

Se logró demostrar la utilidad de los métodos colorimétricos del carbazol y del m-hidroxifenilfenol en la determinación de sustancias pécticas en cáscara de parchita, en base a su sencillez, reproducibilidad y mínimo efecto de compuestos interferentes.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo, Científico y Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la UCLA por el financiamiento a esta investigación.

LITERATURA CITADA

1. Barazarte, H., T. García, L. Durán, L. Chaparro y J. Gámez. 2007. Evaluación de la exactitud y precisión de los métodos m-hidroxifenilfenol y carbazol aplicados en la cuantificación de sustancias pécticas. *Agrollanía*. 4: 53-62.
2. Blumenkrantz, N. y G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 5: 484-489.
3. Carbonell, E., E. Costell y L. Durán. 1989. Evaluation of various methods for measurement of pectin content in jam. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72(4): 689-693.
4. Carbonell, E., E. Costell y L. Durán. 1990. Determinación del contenido en pectinas en productos vegetales. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 30(1): 1-9.
5. Cheftel, J. y H. Cheftel. 1976. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de Los Alimentos.

Edit. Acribia. Zaragoza, España.

6. Ibarz, A., A. Pagán, F. Tribaldo y J. Pagán. 2006. Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the m-hydroxydiphenyl pectin determination methods. *Food Control.* 17: 890-893.
7. Kitner, P.K. y J.P. Van Buren. 1982. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. *J. Food Sci.* 47: 756-759.
8. McCready, R. y E. McComb. 1952. Extraction and determination of total pectin materials in fruits. *Anal. Chem.* 24: 1986-1988.
9. Meseguer, I., V. Aguilar, M.J. González y C. Martínez. 1998. Extraction and colorimetric quantification of uronic acids of the pectin fraction in fruit and vegetables. *J. Food Comp. Anal.* 11: 285-291.
10. Rodríguez, M.D., A. Redondo y M.J. Villanueva. 1992. Estudio comparativo de los métodos de m-hidroxifenilfenol y 3,5-dimetilfenol para determinar sustancias pécticas en nabo (*Brassica napus*). *Alimentaria.* 79: 79-82.
11. Ros, J.M., D. Saura, L. Coll y J. Laencina. 1992. Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pécticas y actividades enzimáticas pectolíticas. *Rev. Alim. Equip. Tecnol.* 2: 149-155.
12. Thakur, B.R., R.K. Singh y A.K. Handa. 1997. Chemistry and uses of pectin – A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37 (1): 47-73.
13. Visciglio, S.B. y N. San Juan. 2000. Determinación del contenido de pectinas en cáscara de frutas cítricas: modificación y optimización del método del carbazol. *S. Cs. Ing. Alim.* 2: 719-733.
14. Willats, W.G., J.P. Knox y J.D. Mikkelsen. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 97-104.
15. Yapo, B.M. y K.L. Koffi. 2006. Yellow passion fruit rind-a potential source of low-methoxyl pectin. *J. Agric. Food Chem.* 54(7): 2738-2744.