



## Comunicación corta

# CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS EN LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS URÓNICOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN MEZCLAS DE OLIGOGALACTURÓNIDOS

### Short communication

## Metrological characteristics in uronic acid determination for quality control of oligogalacturonide mixtures

Yuliem Mederos Torres<sup>1✉</sup>, Inés M. Reynaldo Escobar<sup>1</sup>  
y Josefa Hormaza Monte-Negro<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** Uronic acid content determination for the quality control of oligogalacturonides is extremely important, considering that they are directly related to their biological activity. The aim of this research was to analyze the metrological characteristics of Blumenkrantz and Asboe-Hansen spectrophotometric method, for uronic acid determination in oligogalacturonide mixtures, by using m-hydroxydiphenyl as chromophore. Linearity, precision and limits of detection and quantification were among the metrological characteristics analyzed. Blumenkrantz and Asboe-Hansen method resulted to be adjusted to a linear model within a concentration range of 10-80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Regarding such model, the correlation coefficient value is  $r = 0,996$  whereas the determination coefficient is  $R^2 = 0,992$ , indicating a very good correlation between uronic acid concentration and its absorbance. The precision of this method was determined through two procedures, which did not surpass the established value as a variability limit of 5 %. Detection and quantitation limits were in the order of  $1,6 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $5 \pm 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Uronic acid concentration was recorded in the order of 890  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**RESUMEN.** La determinación del contenido de ácidos urónicos en el control de la calidad de los oligogalacturónidos es sumamente importante, teniendo en cuenta que ellos están directamente relacionados con la actividad biológica que estos presentan. El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis de las características metroológicas de la técnica espectrofotométrica de Blumenkrantz y Asboe-Hansen, en la determinación de ácidos urónicos en mezclas de oligogalacturónidos, empleando como cromóforo el m-hidroxidifenilo. Dentro de las características metroológicas analizadas se encontraron la linealidad, la precisión y los límites de detección y cuantificación. Como resultado el método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen se ajustó a un modelo lineal en el rango de concentración de 10-80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para el modelo ajustado, el valor del coeficiente de correlación es  $r = 0,996$  y el coeficiente de determinación es  $R^2 = 0,992$ , lo cual indicó muy buena correlación entre la concentración de ácidos urónicos y su absorbancia. La precisión del método se determinó por dos procedimientos, los cuales no sobrepasaron el valor establecido como límite de variabilidad del 5 %. Los límites de detección y cuantificación estuvieron en el orden de  $1,6 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $5 \pm 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. La concentración de ácidos urónicos se encontró en el orden de los 890  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Key words:** pectic acid, uronic acids, quality control, oligogalacturonides

**Palabras clave:** ácido péctico, ácidos urónicos, control de la calidad, oligogalacturónidos

## INTRODUCCIÓN

Los oligogalacturónidos están compuestos por oligómeros lineales de ácido D-galacturónico unidos por enlaces del tipo  $\alpha$  (1-4), que pueden ser obtenidos por hidrólisis ácida o enzimática de los ácidos pécticos (1). Los oligogalacturónidos han demostrado tener una variada actividad biológica en las plantas,

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32 700.

<sup>2</sup> Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras (ICINAZ), carretera al central Manuel Martínez Prieto km 2½, Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ [yuliem@inca.edu.cu](mailto:yuliem@inca.edu.cu)

dentro de las cuales se encuentran la promoción de procesos morfogénéticos en especies vegetales (2) y la estimulación del crecimiento vegetal (3), entre otras. Dicha actividad biológica está determinada por su grado de polimerización, la especie de planta y la concentración a la cual son aplicados. También ha sido estudiado su empleo en el secuestro de metales pesados (4). En este sentido, se ha estudiado el uso de los oligogalacturónidos en la disminución de la toxicidad del ión  $\text{Cu}^{2+}$  en plántulas de tomate, produciendo cambios en el patrón de absorción de este metal (5).

El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), cuenta con una tecnología patentada a nivel nacional para la obtención de mezclas de oligogalacturónidos. El control de la calidad de estas mezclas incluye la determinación del contenido de ácidos urónicos, azúcares neutros y azúcares reductores presentes en este. Dentro de estas características nombradas, el contenido de ácidos urónicos es uno de los más importantes, pues está estrechamente relacionado con la actividad biológica que estos oligosacáridos presentan en las plantas. Dicha actividad biológica puede estar basada en la capacidad de los oligogalacturónidos de formar un enrejado molecular con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  nombrado caja de huevo (6). Esta conformación es posible, debido a las múltiples cargas negativas que presentan los oligogalacturónidos, desde el punto de vista estructural y que depende de su grado de polimerización.

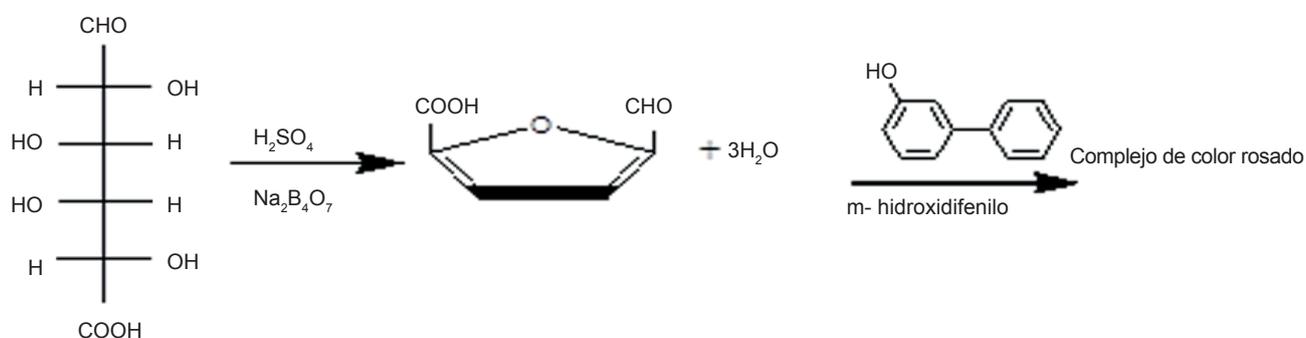
La evaluación del contenido de ácidos urónicos, en forma de ácido galacturónico, puede ser realizada mediante la evaluación espectrofotométrica. Para ello, los métodos espectrofotométricos más conocidos en esta determinación son aquellos que emplean como cromóforos al m-hidroxidifenilo (7, 8, 9, 10), el 3,5-dimetilfenol (11, 12) y el carbazol (13, 14). Más recientemente se ha empleado la cromatografía líquida de alta resolución (15, 16) y la electroforesis capilar zonal, como método de cuantificación de ácido galacturónico con detección por UV (17).

De manera general, el procedimiento que emplea el m-hidroxidifenilo como cromóforo (7) es el más citado de todos y se caracteriza por ser cuantitativo, sensible y específico, razones por las cuales se seleccionó como técnica de control de la calidad de las mezclas de oligogalacturónidos. Este método se basa en la aparición de un cromógeno de color rosado cuando el ácido urónico es calentado a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una mezcla de ácido sulfúrico/tetraborato de sodio y posteriormente tratado con m-hidroxidifenilo (Figura 1).

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de algunas características metodológicas en la técnica de determinación de ácidos urónicos, empleando como cromóforo el m-hidroxidifenilo y de esta forma contribuir a su validación posterior.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La mezcla de oligogalacturónidos se obtuvo por hidrólisis enzimática (18), con el empleo de ácido poligalacturónico (SIGMA) y el preparado pectinolítico Pectinase obtenido a partir del hongo *Aspergillus aculeatus* de la corporación Novozyme A/S. La determinación del contenido de ácidos urónicos se realizó de acuerdo al método propuesto por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (7), empleando como patrón ácido galacturónico en el rango de concentraciones de 10, 20, 40, 60 y  $80\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . Las lecturas se realizaron a  $520\text{ nm}$  en un espectrofotómetro UV visible Genesys 6 de la corporación *Thermo Electron*. Las características metodológicas analizadas fueron la linealidad, la precisión y los límites de detección y cuantificación del método (19, 20). La linealidad ( $n=3$ ) se determinó por el método de los mínimos cuadrados, con la evaluación de la pendiente, el intercepto, los coeficientes de correlación y determinación, así como la existencia de falta de ajuste, el análisis del gráfico de residuos y el coeficiente de variación del factor respuesta (CVf); este último se determinó a partir de la siguiente secuencia de ecuaciones.



**Figura 1. Representación esquemática de la formación del complejo de color rosado entre el ácido galacturónico y el m-hidroxidifenilo**

$$f_i = \frac{y_i}{x_i} \quad f = \frac{\sum f_i}{n}$$

$$SD_f = \sqrt{\frac{\sum (f_i - f)^2}{n-1}} \quad CVf = \frac{SD_f}{f} * 100$$

donde:

$f$  es el factor respuesta,  $y_i$  y  $x_i$  son la absorbancia y la concentración del ácido galacturónico, respectivamente,  $SD_f$  es la desviación estándar del factor respuesta,  $CVf$  es el coeficiente de variación del factor respuesta y  $n$  el número de réplicas.

La precisión se determinó en términos de repetibilidad, manteniendo el mismo procedimiento de medición, el mismo operador y sistema de medición, así como iguales condiciones de operación, con igualdad de réplicas, en un corto período de tiempo (21). La precisión se expresó mediante el CV y se determinó como el cociente entre la desviación estándar y el valor medio del factor respuesta, expresado en porcentaje. La precisión se evaluó por dos vías, mediante la determinación del CV (a partir del análisis de tres niveles de concentración de ácido galacturónico 10, 40 y 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y mediante el análisis de seis muestras de oligogalacturónidos en condiciones de repetibilidad. Para el análisis de la mezcla de oligogalacturónidos se realizaron diluciones de estas a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en agua desionizada. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se determinaron mediante las fórmulas de Long and Winefordner (22).

$$LOD...y...LOQ = \frac{K.SD_B}{m \pm t_a SD_m}$$

donde:

$K= 3$  para LOD y 10 para LOQ

$SD_B$  = desviación estándar de la absorbancia del blanco

$m$  es la media de la pendiente de las curvas de calibración

$t_a$  = distribución t Student para  $a= 0,01$

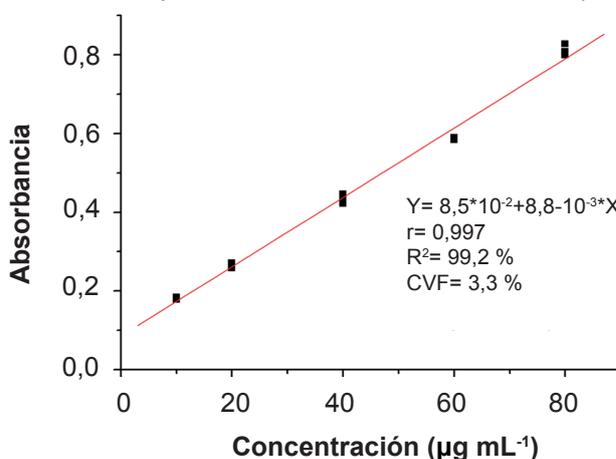
$SD_m$  = desviación estándar de las pendientes de las curvas de calibración

Los límites se calcularon a partir del análisis de siete blancos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la linealidad de la técnica de determinación de los ácidos urónicos se realizó a través de su curva de calibración en el rango de concentración de 10-80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 2). El análisis de la regresión mostró que se ajustó a un modelo lineal descrito por la ecuación de primer grado  $y= 0,09 + 8,8 \cdot 10^{-3}x$  para el rango de concentraciones

especificado. Para el modelo ajustado, el valor del coeficiente de correlación es  $r= 0,996172$ , mientras que el coeficiente de determinación es  $R^2= 0,992$ , lo cual indica una excelente correlación entre la concentración y la absorbancia. El análisis de significación de la pendiente mostró que la probabilidad de error es menor que 0,05 ( $P= 0,0000$ ), lo cual indicó que esta es significativamente diferente de cero. Por otra parte, el análisis de significación del intercepto mostró que la probabilidad de cometer error, determinado a partir de la prueba t de Student es menor que 0,05 ( $P= 0,0000$ ), lo cual indica que el intercepto (0,09) debe ser tenido en cuenta al realizar los análisis. El coeficiente de variación del factor respuesta (CVf) en el rango de concentraciones analizado fue de 3,3 %, el cual es menor que 5 %, valor conocido como límite de variabilidad, por lo cual se considera adecuado (23).



Se emplea ácido galacturónico como patrón y m-hidroxidifenilo como cromóforo ( $n= 3$ )

**Figura 2. Curva de calibración empleada en la determinación del contenido de ácidos urónicos por el método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (7)**

La prueba de falta de ajuste verifica si el modelo seleccionado (modelo lineal) es adecuado para describir los datos observados o si debe ser utilizado un modelo más complejo. La probabilidad ( $P= 0,0012$ ) asociada al valor de  $F$  de la falta de ajuste resultó menor que 0,05, por lo que hay una falta de ajuste al modelo lineal estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 95 % (Tabla).

Aun cuando es conocido que el análisis de la linealidad en un método de determinación espectrofotométrico se realiza a partir de la búsqueda de la ecuación lineal que lo describa en un rango de concentraciones especificado, el empleo del programa estadístico *STATGRAPHICS PLUS 5.1* (24) permite verificar, a partir de modelos curvilíneos alternativos, qué modelo matemático describe mejor el sistema.

### Indicadores de precisión en las curvas de calibración de ácido galacturónico, determinación de los límites de detección y cuantificación

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorbancia media	DE	CV	LOD	LOQ
Ácido galacturónico	10	0,182	0,003	1,77 %	$1,6 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$	$5 \pm 1 \mu\text{g mL}^{-1}$
	40	0,434	0,012	2,76 %		
	80	0,808	0,013	1,64 %		
Mezcla de oligogalacturónidos	1000	Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) 890	29	3,3 %		

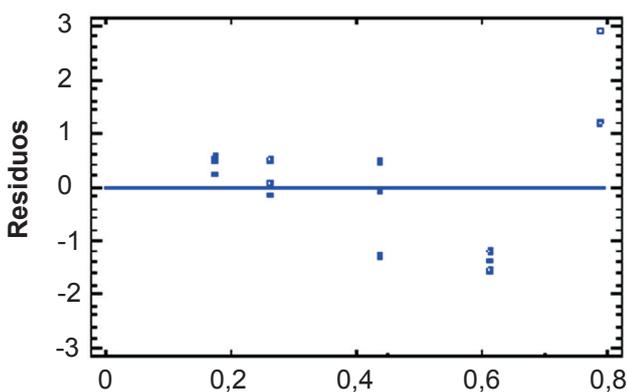
DE: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

El modelo ajustado que mejor describió al sistema fue raíz cuadrada con un  $R^2 = 99,41\%$ ; sin embargo, el modelo lineal solo difirió de este en un  $0,17\%$ , lo que concuerda con la falta de ajuste encontrada en el análisis de varianza. Por otra parte, el gráfico de residuos mostró que los resultados presentan una distribución aleatoria, lo cual confirma que el modelo escogido es el adecuado (Figura 3).



**Figura 3. Gráficos de residuos correspondientes a las curvas de calibración empleadas en la determinación de ácidos urónicos**

La evaluación de la linealidad en un método espectrofotométrico se basa en la propiedad de las sustancias de absorber la luz y debe cumplir con la Ley de Lambert-Beer, que plantea que la luz absorbida es directamente proporcional a la concentración de la sustancia (25). Por tanto, se puede decir que esta relación quedó descrita a partir de la ecuación lineal de primer grado,  $y = 0,09 + 8,8 \cdot 10^{-3}x$ , cuyos coeficientes de correlación y determinación demostraron la proporcionalidad existente entre la concentración y absorbancia, cumpliendo así con la Ley de Lambert-Beer.

La precisión del método se evaluó en términos de repetibilidad. La determinación del coeficiente de variación a tres niveles de concentración diferentes mostró que este oscila entre el  $1,64$  y  $2,76\%$ , el cual se encuentra por debajo del valor establecido como límite de variabilidad ( $5\%$ ), por lo que el método se considera adecuado (Tabla).

La determinación del límite de detección y cuantificación en la curva de calibración (Tabla) mostró que el nivel más bajo de ácidos urónicos que puede ser detectado mediante esta técnica es de  $1,6 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A su vez, la concentración más baja que puede ser determinada con precisión es  $5 \pm 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Los valores de límites de detección y cuantificación calculados indican que el método de determinación de ácidos urónicos es adecuado, teniendo en cuenta que la concentración de ácidos urónicos presente en muestras de mezclas de oligogalacturónidos está en el orden de los  $890 \mu\text{g mL}^{-1}$ , siendo estos los componentes mayoritarios, representando aproximadamente el  $89\%$  de las muestras. Dicha concentración está en el orden de los valores indicados en la literatura en la caracterización de ácido péctico comercial (SIGMA) de origen cítrico (26), donde la concentración de ácidos urónicos representó el  $87\%$  de la muestra analizada.

La determinación del límite de detección permitió referir que la respuesta lineal del método comprendió el rango de  $1,6$  a  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Este resultado se encontró en el orden de lo informado por otros autores (27), al realizar la determinación espectrofotométrica de los ácidos urónicos en muestras de té verde, donde la respuesta lineal del método oscila entre  $1$  y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## CONCLUSIONES

De manera general y a modo de conclusión, teniendo en cuenta todas las características metrológicas analizadas anteriormente, se puede decir que la técnica de determinación de ácidos urónicos, de acuerdo al método propuesto por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (7), puede ser empleado como técnica de control de la calidad en mezclas de oligogalacturónidos, puesto que cumple con el criterio de linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación adecuados para este fin.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mederos, T. Y.; Hormaza, M. J.; Reynaldo, E. I. y Montesino, S. R. "Caracterización de mezclas de oligogalacturónidos bioactivos". *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, vol. 42, no. 2-3, 2011, pp. 1-5, ISSN 1015-8553.
2. Terry, A. E.; Ruiz, P. J.; Tejada, P. T. y Reynaldo, E. I. "Efectividad agrobiológica del producto bioactivo Pectimor® en el cultivo del Rábano (*Raphanus sativus* L.)". *Cultivos Tropicales*, vol. 35, no. 2, junio de 2014, pp. 105-111, ISSN 0258-5936.
3. Alvarez, B. I.; Reynaldo, E. I.; Cartaya, R. O. y Teheran, Z. "Efectos de una mezcla de oligogalacturónidos en la morfología de hortalizas de importancia económica". *Cultivos Tropicales*, vol. 32, no. 3, septiembre de 2011, pp. 52-57, ISSN 0258-5936.
4. Ozturk, S.; Aslim, B.; Suludere, Z. y Tan, S. "Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition". *Carbohydrate Polymers*, vol. 101, 30 de enero de 2014, pp. 265-271, ISSN 0144-8617, DOI 10.1016/j.carbpol.2013.09.040.
5. Cartaya, O. E.; Reynaldo, I.; Peniche, C. y Garrido, M. L. "Empleo de polímeros naturales como alternativa para la remediación de suelos contaminados por metales pesados". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 27, no. 1, febrero de 2011, pp. 41-46, ISSN 0188-4999.
6. Cabrera, J. C.; Cambier, P. y Cutsem, P. "Drug encapsulation in pectin hydrogel beads. A systematic study of simulated digestion media". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, 2011, pp. 292-299, ISSN 0975-1491.
7. Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G. "New method for quantitative determination of uronic acids". *Analytical Biochemistry*, vol. 54, no. 2, agosto de 1973, pp. 484-489, ISSN 0003-2697, DOI 10.1016/0003-2697(73)90377-1.
8. Caesar-TonThat, T.; Sainju, U. M.; Wright, S. F.; Shelver, W. L.; Kolberg, R. L. y West, M. "Long-term tillage and cropping effects on microbiological properties associated with aggregation in a semi-arid soil". *Biology and Fertility of Soils*, vol. 47, no. 2, 18 de noviembre de 2010, pp. 157-165, ISSN 0178-2762, 1432-0789, DOI 10.1007/s00374-010-0508-2.
9. Li, T.; Zhu, R.; Dong, Y.; Liu, Y.; Li, S. y Chen, G. "Effects of Pectin Pentaoligosaccharide from Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. Major) on the Activity and mRNA Levels of Enzymes Involved in Fatty Acid Oxidation in the Liver of Mice Fed a High-Fat Diet". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 31, 7 de agosto de 2013, pp. 7599-7605, ISSN 0021-8561, DOI 10.1021/jf400283w.
10. Parwani, L.; Bhatnagar, M.; Bhatnagar, A. y Sharma, V. "Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing". *Journal of Applied Phycology*, vol. 26, no. 3, 6 de noviembre de 2013, pp. 1473-1482, ISSN 0921-8971, 1573-5176, DOI 10.1007/s10811-013-0180-7.
11. Luzio, G. A. "Determination of galacturonic acid content of pectin using a microtiter plate assay". *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, vol. 117, 2004, pp. 416-421, ISSN 0097-1219.
12. Silva, T. C. F.; Colodette, J. L.; Lucia, L. A.; Oliveira, R. C. de; Oliveira, F. N. y Silva, L. H. M. "Adsorption of Chemically Modified Xylans on Eucalyptus Pulp and Its Effect on the Pulp Physical Properties". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 50, no. 2, 19 de enero de 2011, pp. 1138-1145, ISSN 0888-5885, DOI 10.1021/ie101960a.
13. Jing, Y.; Zhu, J.; Liu, T.; Bi, S.; Hu, X.; Chen, Z.; Song, L.; Lv, W. y Yu, R. "Structural Characterization and Biological Activities of a Novel Polysaccharide from Cultured *Cordyceps militaris* and Its Sulfated Derivative". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no. 13, 8 de abril de 2015, pp. 3464-3471, ISSN 0021-8561, DOI 10.1021/jf505915t.
14. Li, W.; Xia, X.; Tang, W.; Ji, J.; Rui, X.; Chen, X.; Jiang, M.; Zhou, J.; Zhang, Q. y Dong, M. "Structural Characterization and Anticancer Activity of Cell-Bound Exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no. 13, 8 de abril de 2015, pp. 3454-3463, ISSN 0021-8561, DOI 10.1021/acs.jafc.5b01086.
15. Nagel, A.; Sirisakulwat, S.; Carle, R. y Neidhart, S. "An Acetate-Hydroxide Gradient for the Quantitation of the Neutral Sugar and Uronic Acid Profile of Pectins by HPAEC-PAD without Postcolumn pH Adjustment". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 9, 5 de marzo de 2014, pp. 2037-2048, ISSN 0021-8561, DOI 10.1021/jf404626d.
16. Zhang, Y.; Zhang, P.; Wang, Z. y Huang, L. "An Innovative Derivatization Method for Simultaneous Determination of Uronic Acids and Neutral and Amino Sugars in Coexisting Samples by Hplc-Esi-MS/MS". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 34, no. 16, 1 de octubre de 2011, pp. 1754-1771, ISSN 1082-6076, DOI 10.1080/10826076.2011.579216.
17. Xia, Y.; Liang, J.; Yang, B.; Wang, Q. y Kuang, H. "A new method for quantitative determination of two uronic acids by CZE with direct UV detection". *Biomedical Chromatography*, vol. 25, no. 9, 1 de septiembre de 2011, pp. 1030-1037, ISSN 1099-0801, DOI 10.1002/bmc.1564.
18. Cabrera, J.; Iglesias, R. y Hormaza, J. *Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal*. no. 22859, Inst. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, La Habana, Cuba, 2003.
19. Ortega, G. M.; Rodríguez, M. C. y Zhurbenko, R. "Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos". *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, vol. 48, no. 2, agosto de 2010, pp. 162-176, ISSN 1561-3003.
20. Perdomo, R. R.; Otero, M. G. y González, M. "Validación del método del sulfato de brucina para la determinación de nitrógeno forma de nitrato en aguas superficiales". *Revista Cubana de Química*, vol. 24, no. 2, 2012, pp. 155-165, ISSN 2224-5421.
21. ISOI. *International Vocabulary of Metrology. Basic and general concepts and associated terms*. No. ISO/IEC 99: 2007, Geneva, Switzerland, 2007, p. 92.
22. Long, G. L. y Winefordner, J. D. "Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition". *Analytical Chemistry*, vol. 55, no. 7, 1 de junio de 1983, p. 712A-724A, ISSN 0003-2700, DOI 10.1021/ac00258a001.

23. Oficina Nacional de Normalización. *Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos*. No. NC TS 368: 2010, La Habana, Cuba, 2010, p. 48.
24. Statistical Graphics Corp. *STATGRAPHICS® Plus* [en línea]. (ser. Profesional), versión 5.1, [Windows], 2000, Disponible en: <<http://www.statgraphics.com/statgraphics/statgraphics.nsf/pd/pdpricing>>.
25. Owen, T. *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy: A Primer*. 1ª ed., edit. Agilent Technologie, German, 2000, 136 p., Publication number 5980-1397.
26. Cabrera, J. C.; Gutiérrez, A. y Varela, M. "Comparación del ácido péctico obtenido a partir de albedo de lima persa con el polipectato de sodio reactivo". *Cultivos Tropicales*, vol. 16, no. 3, 1995, pp. 29–31, ISSN 1819-4087.
27. Chen, H.; Zhang, M. y Xie, B. "Quantification of Uronic Acids in Tea Polysaccharide Conjugates and Their Antioxidant Properties". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 11, 1 de junio de 2004, pp. 3333-3336, ISSN 0021-8561, DOI 10.1021/jf0349679.

Recibido: 17 de diciembre de 2014

Aceptado: 28 de julio de 2015