

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



**«EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINA DE LA  
CASCARILLA DEL *Theobroma cacao Linnaeus* (CACAO) PARA LA  
INMOVILIZACIÓN DE *Saccharomyces Cerevisiae* Y SU  
APLICACIÓN EN LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE  
MANZANA»**

**Tesis presentada por las Bachilleres:**

**Molina Tejada, Nelly Lissette**

**Tintaya Medina, Liliana**

**Para optar el Título Profesional:**

**Ingeniera Biotechnóloga**

**Asesor:**

**PhD Villanueva Salas, José Antonio**

**AREQUIPA – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 15046211  
N° Trámite en Fac. 255-2015  
Fecha Recep. Fac. 06-11-2015

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: *TINTAYA MEDINA, Liliana*  
*MOLINA TEJADA, Nelly Lissette*

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE PECTINA A PARTIR DE CASCARILLA DE CACAO PARA LA ENCAPSULACION DE LEVADURAS"**

DICTAMINADORES: 1) *Ing. Eugenia Zeballos Delgado* 2) *Mgter. Roxana Bardales Álvarez*

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"ENCAPSULAMIENTO DE LEVADURAS DE PELLETS DE PECTINA EXTRAIDA Y CARACTERIZADA DE LA CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao L.*)"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMAS: *[Firmas]* (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA *21-12-2015*

ASESOR: *Dr. José Villanueva Salas*

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE PECTINA DEL *Theobroma cacao Linnaeus* (Cascarilla de cacao) PARA LA INMOVILIZACION DE LEVADURAS"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad  
Atentamente

FIRMA *[Firma]* FECHA *06/12/17*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Ing. Eugenia Zeballos Delgado* 3) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*  
2) *Mgter. Roxana Bardales Alvarez*

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **"EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE PECTINA DE LA CASCARILLA DEL *Theobroma cacao Linnaeus* (Cacao) PARA LA INMOVILIZACION DE *Saccharomyces cerevisiae* Y SU APLICACIÓN EN LA FERMENTACION DEL MOSTO DE MANZANA"**, y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los límites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMA *[Firma]* (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA *11-01-18*

JURADOS: PRESIDENTE *ING. EUGENIA ZEBALLOS DELGADO*  
VOCAL *Mgter. ROXANA BARDALES ALVAREZ*  
SECRETARIO *ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS*

FECHA *15/01/18* HORA *19.00* LOCAL *SDM C-402*

FIRMA DEL DECANO *[Firma]* FECHA *12/01/18*

## AGRADECIMIENTO

*Le agradezco a Dios por permitirme nacer en un hogar con mucho amor.*

*A mis padres por tener la paciencia que tienen conmigo y no permitir que me rinda.*

*A mis hermanos Arthur y Evelyn que siempre me apoyaron de distinta manera en todo lo que hago.*

*A nuestro asesor Ph D José Antonio Villanueva Salas por su tiempo y orientación en este proyecto.*

*A mi mejor amiga Mafer que siempre se preocupó con el tema de la tesis y me incentivo que lo hiciera.*

*A mis amigas del trabajo que con su apoyo conseguí seguir adelante en este proyecto.*

*Nelly Lissette Molina Tejada*

## DEDICATORIA

*Esta tesis se la dedico a mis abuelitas, que siempre desearon lo mejor para mí. A mis padres Henry Molina y Lisseti Tejada por ser los mejores consejeros del mundo y enseñarme que la vida es hermosa, sin su apoyo esto no hubiera sido posible.*

*Nelly Lissette Molina Tejada*



## AGRADECIMIENTO

*A Dios y a la Virgen María, que siempre me acompañan y forman parte de mis creencias y mi fe, por las bendiciones de las cuales estoy agradecida.*

*A mis padres Ricardo y Bernardina y a mi familia, por su apoyo durante los años de formación y a lo largo de este trayecto.*

*Al Ph D José Villanueva, asesor de esta investigación, por la orientación, exigencia e incentivo para la realización de esta tesis.*

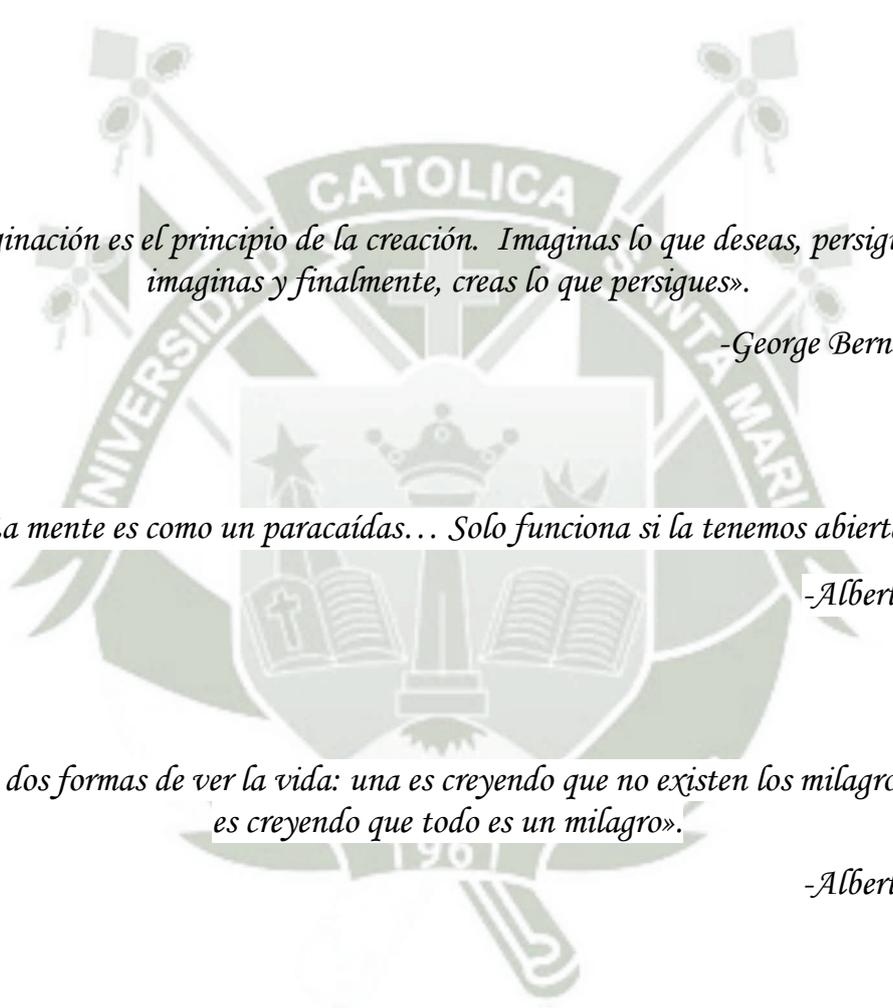
*Al Ph D Jaime Cárdenas por su orientación y colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.*

*Al equipo de Control de Calidad y a Georgia, Máster en Química del Medio Ambiente, por la ayuda prestada en las técnicas de cuantificación realizadas.*

*A la Sra. Luisa, auxiliar de laboratorio, quien con su apoyo constante y palabras de ánimo ayudó a culminar este proyecto.*

*A Totoro y Rocco por todos esos días recostados en el escritorio junto a mí, haciéndome compañía.*

*Liliana Tintaya Medina*



*«La imaginación es el principio de la creación. Imaginas lo que deseas, persigues lo que imaginas y finalmente, creas lo que persigues».*

*-George Bernard Shaw*

*«La mente es como un paracaídas... Solo funciona si la tenemos abierta».*

*-Albert Einstein*

*«Existen dos formas de ver la vida: una es creyendo que no existen los milagros, la otra es creyendo que todo es un milagro».*

*-Albert Einstein*

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>v</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>vii</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>viii</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. CACAO</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. TIPOS DE CACAO .....	2
1.1.2. CACAO CHUNCHO.....	4
1.1.3. PARTES DEL <i>Theobroma cacao Linnaeus</i> .....	5
1.1.4. PARTES DEL FRUTO.....	7
<b>1.2. PECTINA</b> .....	<b>8</b>
1.2.1. ORÍGENES.....	8
1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS PÉCTICAS .....	9
1.2.3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PECTINA .....	11
1.2.4. DEGRADACIÓN DE LA PECTINA .....	13
1.2.5. GRADO DE METOXILACIÓN DE LA PECTINA.....	15
<b>1.3. APLICACIONES DE LA PECTINA</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA PECTINA</b> .....	<b>19</b>
1.4.1. EXTRACCIÓN POR MÉTODO CONVENCIONAL .....	19
1.4.2. EXTRACCIÓN POR MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS .....	19
1.4.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.....	20

1.4.4. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA.....	20
<b>1.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA PECTINA ....</b>	<b>21</b>
1.5.1. PESO EQUIVALENTE.....	21
1.5.2. CONTENIDO DE METOXILO.....	21
1.5.3. CONTENIDO DE ÁCIDO ANHIDROGALACTURÓNICO .....	22
1.5.4. GRADO DE ESTERIFICACIÓN .....	22
1.5.5. PESO MOLECULAR.....	23
<b>1.6. COMPOSICIÓN DE LA PECTINA.....</b>	<b>23</b>
1.6.1. MÉTODO DE CARBOHIDRATOS TOTALES POR DUBOIS .....	23
1.6.2. MÉTODO DE FENOLES TOTALES POR FOLIN CIOCALTEU .....	25
<b>1.7. INMOVILIZACIÓN .....</b>	<b>25</b>
1.7.1. ENCAPSULACIÓN .....	26
1.7.2. GELIFICACIÓN IÓNICA .....	28
1.7.3. INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNA Y POLISACÁRIDO.....	30
1.7.4. MODELO DE LA CAJA DE HUEVOS .....	32
<b>1.8. FERMENTACIÓN .....</b>	<b>33</b>
1.8.1. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA .....	34
 <b>CAPÍTULO II</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1. MATERIALES .....</b>	<b>35</b>
2.1.1. MATERIAL VEGETAL EMPLEADO .....	35
2.1.2. INSUMOS .....	35
2.1.3. MATERIALES DE LABORATORIO .....	35
2.1.4. REACTIVOS QUÍMICOS .....	36
2.1.5. EQUIPOS DE LABORATORIO .....	37

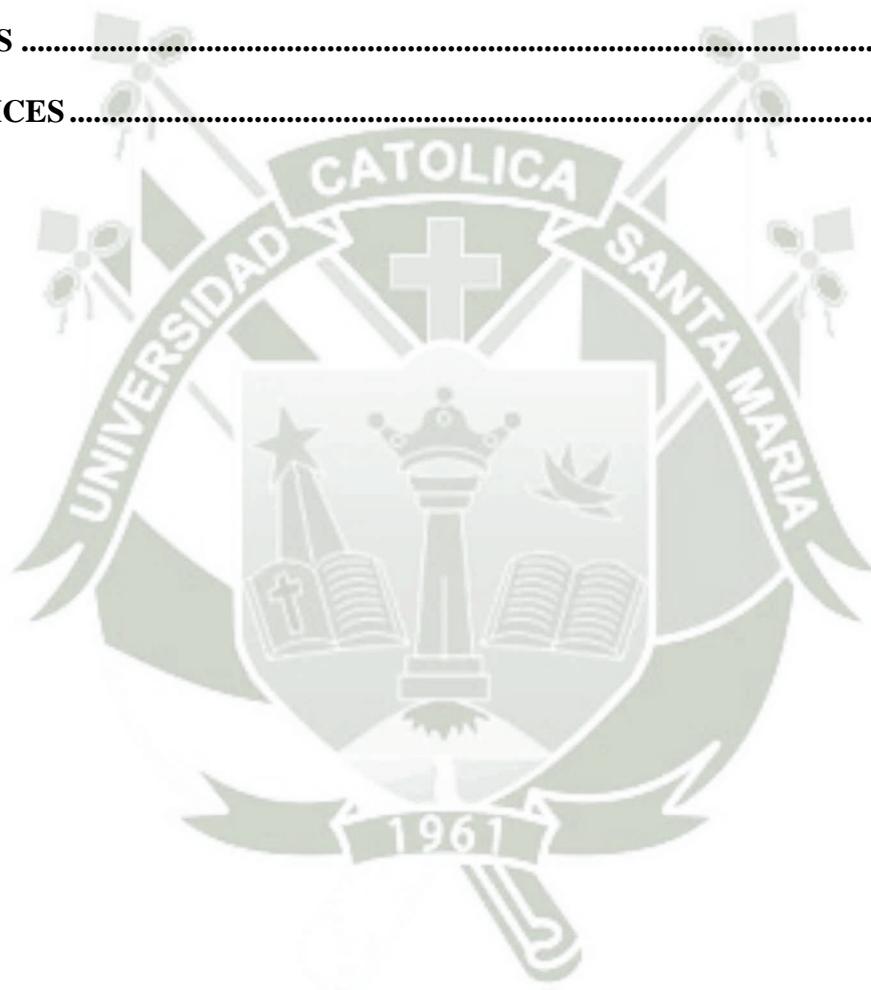
2.1.6. OTROS MATERIALES .....	37
<b>2.2. MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
2.2.1. PROCESO DE OBTENCIÓN DE LA PECTINA .....	38
2.2.1.1. Inactivación de las enzimas pécticas.....	38
2.2.1.2. Lavado de la cascarilla de Cacao .....	38
2.2.1.3. Molienda de la cascarilla de Cacao.....	38
2.2.1.4. Desengrase de la cascarilla de Cacao.....	38
2.2.1.5. Hidrólisis.....	38
2.2.1.6. Precipitación de la pectina .....	39
2.2.1.7. Purificación y secado de la pectina.....	39
2.2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA PECTINA.....	40
2.2.2.1. Determinación del Peso equivalente.....	40
2.2.2.2. Determinación del Contenido de metoxilo .....	40
2.2.2.3. Determinación de Ácido anhidrogalacturónico .....	40
2.2.2.4. Determinación del Grado de esterificación.....	40
2.2.3. COMPOSICIÓN DE LA PECTINA .....	41
2.2.3.1. Determinación de carbohidratos totales por el método de Dubois modificado por Rao .....	41
2.2.3.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu .....	42
2.2.4. INMOVILIZACIÓN DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
2.2.4.1. Activación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
2.2.4.2. Formación de pellets .....	44
2.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS PELLETS .....	46
2.2.5.1. Diámetro de los pellets.....	46
2.2.5.2. Determinación de la densidad celular .....	46
2.2.6. PROCESO DE FERMENTACIÓN USANDO PELLETS .....	47

2.2.6.1. Mosto de manzana .....	47
2.2.6.2. Fermentación del mosto de manzana .....	48
2.2.7. CARACTERIZACIÓN DE LA BEBIDA FERMENTADA.....	48
2.2.7.1. Determinación de los grados Brix.....	48
2.2.7.2. Determinación del grado alcohólico .....	49

### CAPÍTULO III

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. EXTRACCIÓN DE LA PECTINA .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA PECTINA.....</b>	<b>53</b>
3.3.1. DETERMINACIÓN DEL PESO EQUIVALENTE .....	53
3.3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METOXILO.....	54
3.3.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ANHIDROGALACTURÓNICO .....	54
3.3.4. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ESTERIFICACIÓN .....	55
<b>3.4. COMPOSICIÓN DE LA PECTINA.....</b>	<b>58</b>
3.4.1. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES .....	58
3.4.1.1. Preparación de la curva de calibración de glucosa .....	58
3.4.1.2. Contenido de carbohidratos totales en la muestra de pectina ...	60
3.4.2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES .....	62
3.4.2.1. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico .....	62
3.4.2.2. Contenido de fenoles totales en la muestra de pectina .....	63
<b>3.5. EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>65</b>
3.5.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTIMOS.....	65
3.5.2. EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS PELLETS .....	68

3.5.3. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR .....	70
<b>3.6. EVALUACIÓN DE LA BEBIDA FERMENTADA .....</b>	<b>71</b>
3.6.1. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS BRIX .....	71
3.6.2. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS ALCOHÓLICOS .....	73
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>89</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>98</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cacao tipo Criollo .....	2
<b>Figura 2.</b> Cacao tipo Forastero .....	3
<b>Figura 3.</b> Cacao tipo Trinitario .....	3
<b>Figura 4.</b> Cacao tipo Chuncho .....	4
<b>Figura 5.</b> Árbol del <i>Theobroma cacao</i> .....	5
<b>Figura 6.</b> Partes del fruto .....	6
<b>Figura 7.</b> Estructura convencional de la pectina.....	11
<b>Figura 8.</b> Estructura alternativa de la pectina .....	12
<b>Figura 9.</b> Principales modificaciones en las sustancias pécticas .....	14
<b>Figura 10.</b> Pectinas de alto metoxilo .....	16
<b>Figura 11.</b> Pectina de bajo metoxilo .....	16
<b>Figura 12.</b> Pectina de bajo metoxilo amidada .....	17
<b>Figura 13.</b> Reacción del fenol - ácido sulfúrico .....	23
<b>Figura 14.</b> Reacción de deshidratación y condensación de pentosas .....	24
<b>Figura 15.</b> Reacción de deshidratación y condensación de hexosas .....	24
<b>Figura 16.</b> Reacción del reactivo de Folin.....	25
<b>Figura 17.</b> Representación esquemática de dos tipos de partículas poliméricas: A. Cápsula B. Esfera.....	27
<b>Figura 18.</b> Mecanismos de gelificación iónica: (A) Sal insoluble (B) Sal parcialmente soluble.....	29
<b>Figura 19.</b> Principales comportamientos de las mezclas de proteínas: polisacáridos ...	31
<b>Figura 20.</b> Modelo de la caja de huevos (egg-box) .....	32
<b>Figura 21.</b> Proceso de fermentación ocurrido en el citosol .....	33
<b>Figura 22.</b> Proceso de la fermentación alcohólica.....	34
<b>Figura 23.</b> Soluciones patrón de Dubois.....	42

<b>Figura 24.</b> Elaboración de los pellets de pectina-gelatina por gelificación iónica.....	45
<b>Figura 25.</b> Cámara de Neubauer .....	47
<b>Figura 26.</b> Partes del refractómetro .....	49
<b>Figura 27.</b> Medias de los porcentajes de Ácido anhidrogalacturónico relacionadas con la temperatura y tiempo .....	57
<b>Figura 28.</b> Pectina en polvo seleccionada .....	58
<b>Figura 29.</b> Curva de calibración de glucosa .....	59
<b>Figura 30.</b> Muestras de pectina para Dubois .....	60
<b>Figura 31.</b> Muestras de pectina en la curva de calibración de glucosa.....	61
<b>Figura 32.</b> Curva de calibración de ácido gálico .....	63
<b>Figura 33.</b> Muestras de pectina para Folin .....	63
<b>Figura 34.</b> Muestra de pectina en la curva de calibración de ácido gálico.....	64
<b>Figura 35.</b> Pellets de pectina - gelatina en suero fisiológico.....	67
<b>Figura 36.</b> Pellets de pectina - gelatina medidos con Vernier .....	69
<b>Figura 37.</b> Conteo en cámara de Neubauer .....	70
<b>Figura 38.</b> Fermentación del mosto de manzana.....	72
<b>Figura 39.</b> Bebida fermentada obtenida.....	73
<b>Figura 40.</b> Sector de conteo de la cámara de Neubauer .....	95
<b>Figura 41.</b> Conteo de células .....	95
<b>Figura 42.</b> Orden de conteo en zig-zag.....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido de las semillas de cacao por cada 100 g.....	7
<b>Tabla 2.</b> Composición química de la cascarilla de cacao .....	8
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de las sustancias pécticas de acuerdo a diferentes criterios.....	10
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de las técnicas de encapsulación.....	27
<b>Tabla 5.</b> Métodos empleados durante el proceso de hidrólisis .....	39
<b>Tabla 6.</b> Soluciones patrón de Dubois para la curva de calibración .....	41
<b>Tabla 7.</b> Soluciones patrón de Folin para la curva de calibración .....	43
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de pectina - gelatina para la formación de pellets .....	44
<b>Tabla 9.</b> Propiedades cualitativas de la pectina a diferentes parámetros .....	51
<b>Tabla 10.</b> Rendimiento de la pectina .....	52
<b>Tabla 11.</b> Características fisicoquímicas de la pectina extraída .....	56
<b>Tabla 12.</b> Patrones para la curva de calibración de Dubois .....	59
<b>Tabla 13.</b> Contenido de carbohidratos totales en pectina .....	60
<b>Tabla 14.</b> Patrones para la curva de calibración de Folin .....	62
<b>Tabla 15.</b> Contenido de fenoles totales en pectina .....	64
<b>Tabla 16.</b> Evaluación de la formación de los pellets pectina-gelatina.....	66
<b>Tabla 17.</b> Diámetro de los pellets de pectina - gelatina.....	69
<b>Tabla 18.</b> Características organolépticas y fisicoquímicas de la sidra.....	74

## RESUMEN

El Perú tiene un patrimonio natural y concentra en su territorio una riqueza biológica debido a su ubicación geográfica, presenta 10 regiones productoras de cacao que se cultivan en la parte baja de la vertiente occidental de los andes y en la selva peruana entre los 300 y 900 msnm, posee el 60% de las variedades de cacao del mundo.

El 90% del cacao se exporta; originándose de esta manera una gran cantidad de cascarilla de cacao, la cual es obtenida mediante el proceso de descascarillado de la semilla. En países como Brasil y Colombia se han encontrado alternativas para el aprovechamiento de la cascarilla de cacao, otorgándole un valor agregado como la obtención de pectina.

En el presente trabajo se evaluó la extracción de pectina mediante hidrólisis, empleando dos métodos, el convencional utilizando una solución acidulada a un pH 1.5 y el método del ácido cítrico, el cual se realizó a una concentración de 0.3% y a un pH 3 con diferentes temperaturas 90 °C, 75 °C y tiempos 75, 100 minutos; encontrándose que a un tiempo de 75 minutos y a una temperatura de 75 °C se lograron los mejores resultados, obteniéndose así un rendimiento de 2.31%, grado de esterificación de 51.22% y ácido anhidrogalacturónico de 79.90%. La pectina obtenida fue evaluada por métodos fisicoquímicos mediante ello se determinó que es una pectina de baja metoxilación.

Empleando el método de Dubois modificado por Rao se determinó que la cantidad de carbohidratos totales fue de 47.906% y el método de Folin Ciocalteu determinó que la cantidad de fenoles totales fue de 3.728%.

Se probaron diferentes porcentajes de pectina y gelatina para la formación de pellets obteniéndose una relación adecuada de 75% pectina y 25% gelatina; de este modo se logró formar una matriz mixta polimérica por el método de gelificación iónica, en el cual los iones divalentes como el calcio se unen a los grupos carboxílicos de la pectina formándose la caja de huevos. Se realizó pruebas con cloruro de calcio a diferentes concentraciones resultando la más adecuada la de 4%, permitiendo que el proceso de encapsulación sea más eficiente para la protección y adaptación de la levadura en el medio. Los pellets presentaron un diámetro de 0.40 centímetros, asimismo fueron utilizados para la fermentación del mosto de manzana, obteniéndose sidra con un grado alcohólico de 6.1%.

**Palabras claves:** *Theobroma cacao L*, pectina, metoxilo, ácido anhidrogalacturónico, esterificación, gelificación iónica, caja de huevos, pellets, fermentación, sidra.

## ABSTRACT

Peru has a natural heritage and concentrates on its territory a biological wealth due to its geographical location, presents 10 regions of cacao grown in the lower part of the western slope of andes and the Peruvian rainforest between 300 and 900 masl owns 60% of the varieties of cocoa in the world.

The 90% of the cocoa is exported; originating in this way a lot of cocoa husk, which is obtained through the process of peeling of the seed. In countries such as Brazil and Colombia found alternatives to the use of the husks of cocoa, giving a value added as obtaining of pectin.

In the present work, the extraction of pectin by hydrolysis was evaluated, using two methods, the use of an acidulated solution at a pH of 1.5 and the one proposed using citric acid at a pH of 3 with different temperatures at 90 °C, 75 °C and times 75, 100 minutes; a time of 75 minutes and a temperature of 75 ° C the best results were reached, obtaining thus a yield of 2.31%, degree of esterification of 51.22% and anhydrogalacturonic acid of 79.90%. The pectin was selected by physicochemical methods; therefore, it was determined that it is a low methoxylation pectin.

Using the Dubois method modified by Rao, it was determined that the total carbohydrate amount was 47.906% and the Folin Ciocalteu method determined that the total phenol amount was 3.728%.

Different percentages of pectin and gelatin were tested for pellet formation, obtaining an adequate ratio of 75% pectin and 25% gelatin; in this way, a polymeric mixed matrix was formed by the ionic gelation method, in which divalent ions such as calcium are bound to the carboxylic groups of the pectin forming the egg box. Tests were carried out with calcium chloride at different concentrations, the most appropriate being 4%, allowing the encapsulation process to be more efficient for the protection and adaptation of the yeast in the medium. The pellets had a diameter of 0.40 centimeters, they were also used for the fermentation of the apple must, obtaining cider with an alcoholic strength of 6.1%.

**Key words:** *Theobroma cacao L*, pectin, methoxyl, anhydrogalacturonic acid, esterification, ionic gelling, pellets, eggs box, fermentation, cider.



## INTRODUCCIÓN

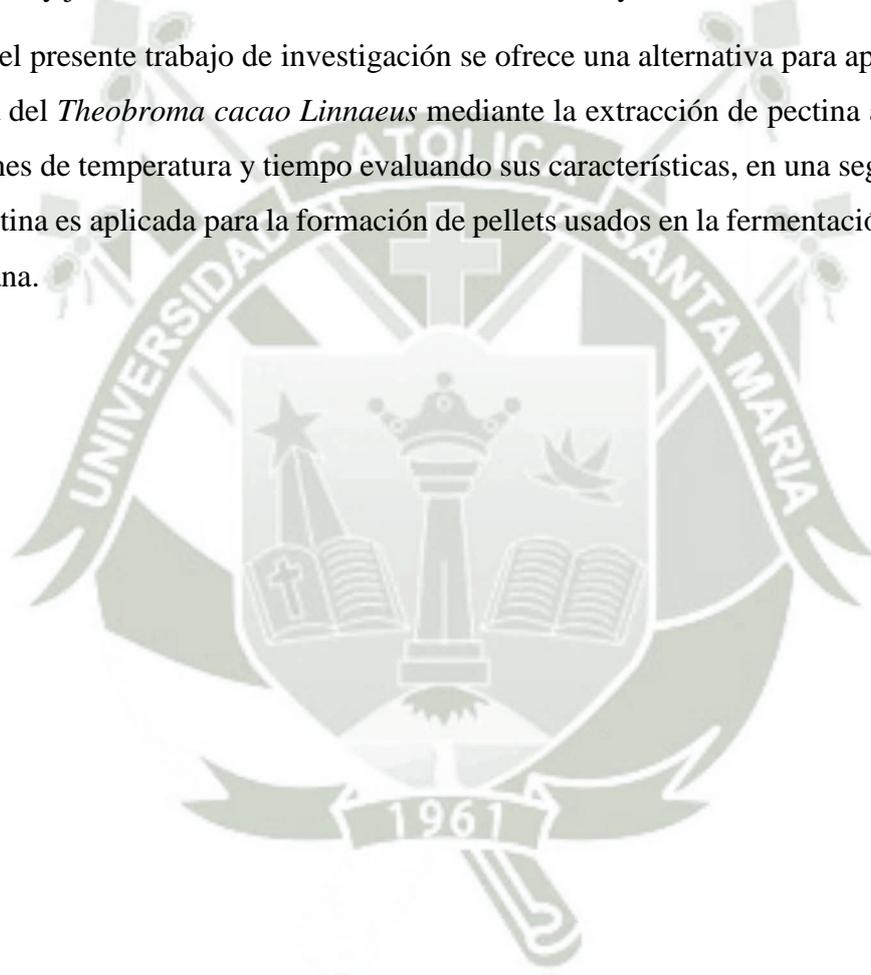
El cacao (*Theobroma cacao Linnaeus*) es originario de las regiones de los bosques lluviosos de América del Sur; los botánicos creen que el cacao es originario de la cabecera del río Amazonas expandiéndose en dos direcciones, originando dos grupos importantes: Criollo y Forastero. El criollo se propagó hacia el norte ingresando en América Central y al sur de México, el Forastero se propagó hacia la cuenca baja amazónica en dirección a las Guayanas<sup>1</sup>. Se encuentra en el área del Alto Amazonas conformado por los países: Brasil, Colombia, Ecuador y Perú, los cuales sus semillas fueron diseminándose por el mundo, iniciando su comercialización<sup>2</sup>.

El grano de cacao es la materia prima de la industria chocolatera y de la industria cacaotera; sólo se aprovecha el grano que representa aproximadamente 12% de peso de cada semilla, lo cual genera cerca de 10 toneladas de cascarilla de cacao por cada tonelada de semilla seca, generando problemas de disposición de los subproductos generados constituidos por cáscara y cascarilla de cacao<sup>2,3</sup>. Esto ha motivado el desarrollo de estudios con el propósito de conferir diversas aplicaciones a la cascarilla de cacao, cuyo aprovechamiento tradicional es como insumo para la alimentación animal, compostaje; su uso ha sido limitado debido a las propiedades químicas de las cascarillas, tales como el contenido de teobromina que es un alcaloide que restringe su aplicación. La cascarilla al acumularse puede convertirse en un foco infeccioso de hongos para las plantaciones, para las industrias otorgarles una disposición final se torna un grave problema.

La cascarilla de cacao ha sido propuesta como alternativa para la obtención de pectinas a nivel comercial debido a su disponibilidad; diversificándose así su uso y otorgándole un valor agregado al fruto del cacao<sup>4</sup>.

La pectina es un polisacárido compuesto por moléculas de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glucosídicos, donde los carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en forma de sal. Las pectinas se usan en la industria alimentaria como gelificantes, espesantes, emulsificantes y estabilizantes, como sustitutos de grasa en alimentos de bajo aporte calórico y su común aplicación es en la manufactura de mermeladas y jaleas<sup>3</sup>, así como en la industria cosmética y farmacéutica.

En el presente trabajo de investigación se ofrece una alternativa para aprovechar la cascarilla del *Theobroma cacao Linnaeus* mediante la extracción de pectina a diferentes condiciones de temperatura y tiempo evaluando sus características, en una segunda etapa dicha pectina es aplicada para la formación de pellets usados en la fermentación de mosto de manzana.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Extraer y caracterizar la pectina de la cascarilla del *Theobroma cacao Linnaeus* para la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* aplicándola en la fermentación del mosto de manzana.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la temperatura y tiempo en la extracción de la pectina mediante hidrólisis a partir de cascarilla del *Theobroma cacao Linnaeus*.
2. Caracterizar física y químicamente la pectina obtenida.
3. Analizar cuantitativamente los carbohidratos y fenoles presentes en la pectina.
4. Evaluar la estabilidad de los pellets de pectina – gelatina en la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Evaluar la capacidad fermentativa de las levaduras inmovilizadas en el mosto de manzana.

## HIPÓTESIS

Dado que la cascarilla del *Theobroma cacao Linnaeus* (Cacao) presenta en su pared celular pectina que posee propiedades gelificantes; es probable su extracción empleando ácido cítrico a diferentes parámetros de tiempo y temperatura para la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes porcentajes de pectina-gelatina en la fermentación del mosto de manzana.

## CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

### 1.1. CACAO

El cacao (*Theobroma cacao Linnaeus*) es un arbusto de dos a tres metros de altura que crece en ambientes tropicales, pertenece a la familia *Sterculaceae*, es un cultivo de tipo permanente con un periodo de vida aproximado de 40 años.

El cacao para desenvolverse adecuadamente necesita temperaturas medias entre 23 °C a 28 °C, altitudes entre 300 – 900 msnm, con una humedad relativa de 70% a 80%; para asegurar una buena producción no es deseable la presencia de vientos fuertes causantes del quebrantamiento de las ramas lo que reduce el área foliar<sup>5</sup>.

El fruto de cacao tiene tamaño, forma y color variable, la pared es dura y gruesa; las semillas de cacao están rodeadas por una pulpa aromática la cual procede de sus tegumentos. La pulpa mucilaginoso está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10%-13%), pentosas (2%-3%), ácido cítrico (1%-2%), y sales (8%-10%).

Durante el proceso de cosecha de las semillas de cacao, la pulpa es removida por fermentación e hidrolizada por microorganismos; siendo conocida en la industria como "exudado"<sup>6</sup>.

La pulpa, que tiene un delicioso sabor tropical, provee el sustrato para varios microorganismos que son esenciales para el sabor del chocolate, los cuales son manifestados totalmente durante el proceso de tostado. Aunque la pulpa es necesaria para la fermentación, a menudo existe más de la necesaria debido a ello ha sido usada para elaborar diversos productos como: jalea de cacao, alcohol, vinagre y pulpa procesada<sup>5</sup>.

### 1.1.1. TIPOS DE CACAO

Existen tres tipos de cacao desde el punto de vista de la botánica<sup>4</sup> que son: los criollos, los forasteros y los trinitarios (híbridos).

#### a. Cacao Criollo:

Esta variedad se caracteriza por sus frutos de cáscara suave y semillas redondas, de color blanco a violeta, dulces y de sabor agradable (**Fig. 1**).

La superficie del fruto posee diez surcos longitudinales marcados, cinco de los cuales son más profundos que los que alternan con ellos. Los lomos son prominentes, verrugosos e irregulares<sup>6</sup>.



**Figura 1. Cacao tipo Criollo**

**Ortiz (2013)<sup>5</sup>**

**b. Cacao Forastero:**

Se cultiva principalmente en: Perú, Ecuador, Colombia, Brasil. Se caracteriza por ser más pequeño, cáscara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa y de granos aplanados de color morado y sabor amargo (**Fig. 2**). Dentro de esta especie destacan Cundeamor, Amelonado, Sambito, Calabacillo y Angoleta<sup>6</sup>.

**Figura 2. Cacao tipo Forastero**Ortiz (2013)<sup>5</sup>**c. Cacao Trinitario (Híbrido):**

Surge del cruce del cacao Criollo y Forastero. Las mazorcas suelen ser de muchas formas y colores; las semillas son más grandes que las del cacao criollo y forastero; las plantas son fuertes, de tronco grueso y hojas grandes (**Fig. 3**). En la actualidad la mayoría de los cacaotales que existen en el mundo son trinitarios<sup>6</sup>.

**Figura 3. Cacao tipo Trinitario**Ortiz (2013)<sup>5</sup>

### 1.1.2. CACAO CHUNCHO

El Perú es uno de los principales lugares de origen del cacao y posee además una increíble diversidad y variabilidad genética. Entre los tipos que se cultivan en diferentes puntos de nuestro país destacan el cacao chuncho, el porcelana de Piura y el nacional del Perú.

El cacao chuncho es una variedad originaria de Cusco, presenta astringencia muy baja, acidez y aroma a hierbas, baja dulzura, amargor de la almendra y aroma frutal medias<sup>7</sup> (**Fig. 4**).



**Figura 4. Cacao tipo Chuncho**

**Rojas (2012)<sup>7</sup>**

En todo el valle de la Convención, se cultiva una variedad de cacao denominada “Chuncho” que ocupa el 80% del área cultivada con edades que fluctúan entre 40 – 80 años. Esta raza local fue domesticada por la comunidad nativa “Matsiguengas” y su área inicialmente cultivada fue ampliada en la época de las haciendas<sup>8</sup>.

Las poblaciones de cacao Chuncho aún conservan un alto grado de pureza, existiendo al interior de ellas variación de sus caracteres morfoagronómicos e industriales. Estas poblaciones no exhiben una completa uniformidad fenotípica, por lo que existen frutos atípicos del cacao Chuncho que se denominan “Común”, “Señorita”, “Blanco” entre otros<sup>9</sup>.

### 1.1.3. PARTES DEL *Theobroma cacao* Linnaeus

Existen diferentes plantas tropicales pertenecientes al género *Theobroma cacao* se han reportado aproximadamente 22 especies, aunque solo una (*Theobroma cacao* Linnaeus, familia *Sterculiaceae*) presenta importante significancia comercial, por tal motivo ha sido estudiada con más detenimiento (Fig. 5). Se desarrolla en suelos no inundables, fértiles, ricos en materia orgánica, profundos y con buen drenaje<sup>6</sup>.



**Figura 5. Árbol del *Theobroma cacao***  
**Oblitas (2015)<sup>10</sup>**

#### a. Hojas y Tallo

Las hojas son grandes, alternas, elípticas u oblondas entre 15-50 centímetros de largo aproximadamente y entre 4-15 centímetros de ancho. Crece en forma dimórfica, con brotes ortotrópicos, presenta ramas plagiotrópicas o en abanico; su corteza externa es de color castaño oscuro, áspera agrietada y delgada<sup>11</sup>.

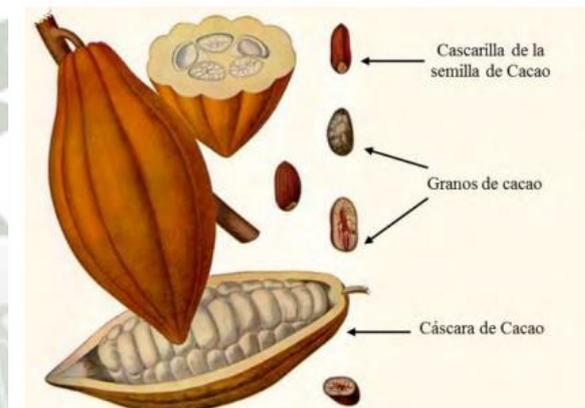
#### b. Flores:

Crece a lo largo del tronco y de las ramas sostenidas por un pedicelo de 1 a 3 cm. Son pequeñas, de color rosado, blanco y púrpura comúnmente, la polinización del cultivo es entomófila destacando la presencia de pequeñas moscas de varias especies del género *Forcipomyia*<sup>11</sup>.

**c. Fruto:**

Es una baya grande comúnmente denominada "mazorca", carnosa, oblonga u ovalada, amarilla o púrpura, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial e incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa o cascarilla<sup>11</sup>.

En la **Fig. 6**, se muestra las partes del fruto de cacao notándose la cáscara, los granos y la cascarilla de la misma.



**Figura 6. Partes del fruto**

**Soto (2012)<sup>12</sup>**

**d. Semillas:**

Las semillas son del tamaño de una almendra, color chocolate o púrpura, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo. No tiene albumen, están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco, de sabor dulce y acidulado.

Todo el volumen de la semilla en el interior está prácticamente ocupado por los 2 cotiledones del embrión, se les llama vulgarmente "habas" o "granos" de cacao.

Como se muestra en la **Tabla 1**, son ricas en almidón, en proteínas, en materia grasa, lo cual les confiere un valor nutritivo real<sup>10</sup>.

Tabla 1. Contenido de las semillas de cacao por cada 100 g<sup>11</sup>

Calorías	456
Agua	3.6 mL
Proteína	12 g
Grasa	46.3 g
Carbohidratos (totales)	34.7 g
Fibra	8.6 g
Glucosa	8–13 g
Sucrosa	0.4–0.9 g
Calcio	106 mg
Fósforo	537 mg
Hierro	3.6 mg
Tiamina	0.17-0.24 mg
Riboflavina	0.14–0.41 mg
Niacina	1.7 mg
Acido ascórbico	3.0 mg
Piridoxina	0.9 mg
Nicotiamida	2.1 mg

#### 1.1.4. PARTES DEL FRUTO

##### i. Cáscara:

La cáscara de cacao representa el 90% del fruto siendo el principal subproducto de la industria chocolatera; generalmente se aprovechan para la alimentación del ganado, su contenido de teobromina limita su consumo y su uso<sup>6</sup>.

Vriesmann<sup>4</sup> menciona que, las cáscaras de cacao presentan cantidades significativas de fibras dietéticas totales, en especial fibras insolubles.

##### ii. Cascarilla:

La cascarilla de cacao es otro de los subproductos del cacao, presenta micronutrientes como vitaminas y minerales, así como macronutrientes proteínas, carbohidratos, lípidos; contiene más de 40% de fibra dietética y otros compuestos como taninos y polifenoles<sup>2</sup>, la composición química de la cascarilla se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición química de la cascarilla de cacao<sup>13</sup>

Composición	Contenido base seca (%)
Humedad	4.60
Fibra dietética total	43.50
Celulosa	19.50
Hemicelulosa	11.80
Lignina	13.70
Proteína bruta	14.90
Lípidos	2.20
Sales minerales	13.50
Azúcares reductores	0.80
Almidón	1.10
Compuestos polifenólicos	0.70
Taninos	0.17
Teobromina	1.10
Cafeína	0.11
Ácido fítico	1.00
Ácido galacturónico	12.20

## 1.2. PECTINA

### 1.2.1. ORÍGENES

La pectina fue descubierta en 1790 cuando Vauquelin encontró primeramente una sustancia soluble de los zumos de fruta. El científico francés Braconnot continuó el trabajo de Vauquelin y encontró que "una sustancia ampliamente disponible en plantas vivas que tenía propiedades gelificantes cuando se le añadía ácido a su solución", la nombró pectina ácida del griego "*pectos*" que significa sólido coagulado.

La pectina fue definida por Kertesz en 1951 como los ácidos pectínicos solubles en agua de grado de metilación variado que son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones determinadas<sup>14</sup>.

### 1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS PÉCTICAS

Son complejos de macromoléculas glucosídicas con alto peso molecular, cargadas negativamente, forman parte del 0.5% a un 4% del peso húmedo del material vegetal, no tienen un peso molecular definido ya que su composición varía dependiendo de la fuente de la cual se obtiene. La pared de las células vegetales se divide en tres capas: laminilla media, pared celular primaria, pared celular secundaria.

Las sustancias pécticas forman los componentes de la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores en forma de pectato de calcio y pectato de magnesio, actuando como cementante intercelular, mientras que en la pared celular secundaria las sustancias pécticas están ausentes.

La pared celular no solo está formada de las sustancias pécticas, sino que también contiene celulosa, xiloglucanos, xilanos, arabinoxilanos, arabinanos, arabinogalactanos, galactanos, glucanos, (galacto)-glucomananos, glicoproteínas y lignina<sup>15</sup>.

En 1927 un comité designado por la American Chemical Society, aborda por primera vez la problemática de la nomenclatura de las sustancias pécticas muy confusas en ese tiempo, según su estructura se clasifican en los siguientes grupos<sup>16</sup>:

#### a. Protopectina

Es la sustancia péctica original insoluble en agua, las cuales se encuentran en las plantas y bajo condiciones controladas de hidrólisis originan ácidos pectínicos. Se encuentra presente en los frutos inmaduros, encontrándose en tejidos vegetales en período de crecimiento<sup>16, 17</sup>.

#### b. Ácidos pectínicos o pectina

Son obtenidos mediante hidrólisis de la protopectina por la acción de las enzimas poligalacturonasas; son ácidos poligalacturónicos coloidales que presentan un contenido elevado en ésteres metílicos, solubles en agua, los cuales son capaces de formar geles en presencia de azúcares, ácidos o iones polivalentes; se

encuentran presentes en los frutos a medida que van madurando. En forma de sal se denominan pectinatos<sup>2, 16, 17</sup>.

### c. Ácidos pécticos

Son aquellas sustancias pécticas constituidas principalmente por ácidos poligalacturónicos prácticamente libres de grupos metoxilo, se originan por la acción de las enzimas pectinmetilesterasa durante el proceso de maduración, promoviendo la remoción de los grupos metílicos de los polímeros, dando origen a sustancias pécticas que no forman gel. Las sales de estos ácidos se denominan pectatos<sup>2, 16, 17</sup>.

En la **Tabla 3**, se muestran los diferentes criterios que se han aplicado para su clasificación.

**Tabla 3. Clasificación de las sustancias pécticas de acuerdo a diferentes criterios<sup>18</sup>**

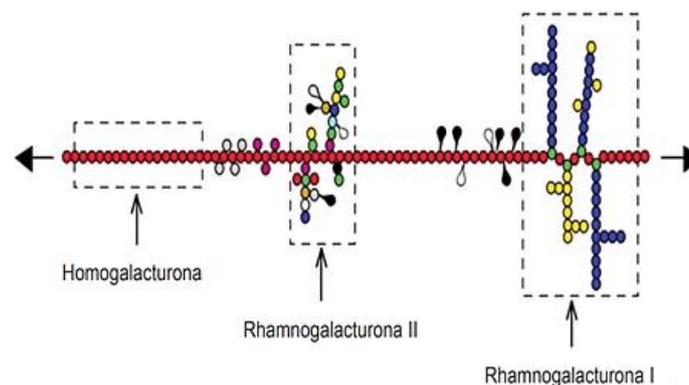
<b>Criterio de clasificación</b>	<b>Componente</b>
<b>Solubilidad</b>	Pectina soluble en agua Pectina soluble en agentes quelantes Pectina soluble en álcali o ácidos
<b>Idem (ACS)</b>	Acido péctico(pectato)* = ácido poligalacturónico** Acido pectínico (pectinato)* = pectinas** Protopectina.
<b>Estructura</b>	Sobre la base de la cadena principal: homogalacturonano, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, xilogalacturonano, apiogalacturonano. Basándose en las cadenas laterales: arabinogalactanos,
<b>Comercial</b>	Pectinas de alto metoxilo Pectinas de bajo metoxilo Pectinas de bajo metoxilo amidadas Pectinas acetiladas

\* en forma de sal    \*\*nombre común.ACS: American Chemical Society

### 1.2.3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PECTINA

Las pectinas están formadas por 17 diferentes monosacáridos, organizados en polisacáridos distintos, agrupados en diferentes tipos de cadena<sup>17</sup>, presenta en su composición ácido o-galacturónico (GalpA) unido por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4), muestra monómeros de ramnosa insertados dentro de la cadena principal de residuos de ácido galacturónico, así como otros monómeros: galactosa, arabinosa, xilosa, ácido glucurónico y fucosa que conformarían la estructura.

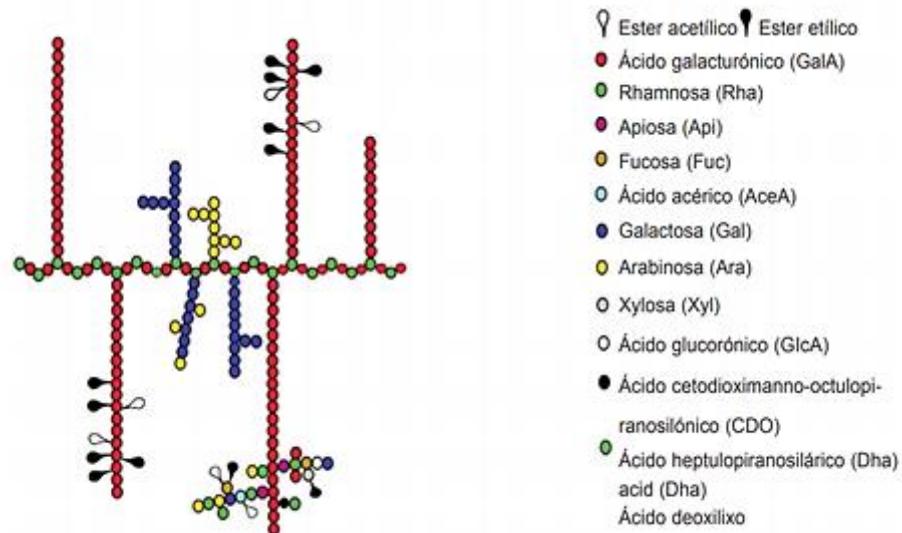
Los tres polisacáridos pécticos que han sido caracterizados y que contienen GalpA en mayor o menor cantidad son: homogalacturona, ramnogalacturona-I y II, galacturonas sustituidas<sup>19</sup>. Hasta hace poco se ha aceptado que los polisacáridos homogalacturona y ramnogalacturona-I son los constituyentes principales de los polímeros pécticos como se observa en la **Fig. 7**.



**Figura 7. Estructura convencional de la pectina**

Chasquibol (2008)<sup>20</sup>

Estudios recientes permiten esquematizar estructuras hipotéticas con breves modificaciones de acuerdo con las nuevas evidencias, el polisacárido homogalacturona es una larga cadena de ramnogalacturona-I<sup>20</sup>, como se muestra en la **Fig. 8**.



**Figura 8. Estructura alternativa de la pectina**

**Chasquibol (2008)<sup>20</sup>**

Los tres principales polisacáridos pécticos que conforman la estructura de la pectina llamados también dominios pécticos son:

**a. Homogalacturona (HG):**

Es un polisacárido péctico presente en la pared celular primaria, representa cerca del 60-65% del total de la pectina. Está formado por unidades de ácido  $\alpha$ -D-ácido glucurónico en uniones 1-4 en padrón lineal, sus grupos carboxilos están parcialmente metil-esterificados<sup>19, 21</sup>.

**b. Ramnogalacturona I (RG-I):**

Representa el 20-35 % de la pectina. Es una cadena formada por los disacáridos  $[\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow ] n$ . Aproximadamente la mitad de sus unidades poseen cadenas laterales como los glucanos (principalmente arabinosa y galactosa) unidas a la ramnosa y el llamado arabinogalactano de tipo 1 conocido como polisacárido péctico neutro<sup>19, 21</sup>.

### c. **Ramnogalacturona II (RG-II):**

Es el 10% de la pectina y el más complejo. Su estructura es de un esqueleto de homogalacturona de mínimo de 8 unidades monoméricas, teniendo cadenas laterales como mínimo 10 diferentes tipos de azúcares, como D-ramnosa, apiosa, D-galactosa, L-galactosa, ácido galacturónico, L-arabinosa, xilosa, ácido L-acético, conservadas altamente en la mayor parte de las especies vegetales<sup>19, 21</sup>.

Aunque el RG-I y el RG-II tienen nombres similares presentan estructuras muy diferentes.

### 1.2.4. **DEGRADACIÓN DE LA PECTINA**

Las sustancias pécticas pueden degradarse por dos mecanismos químicos principales, los cuales se esquematizan en tres diferentes reacciones, en la **Fig. 9** se observan los mecanismos químicos de degradación de la pectina.

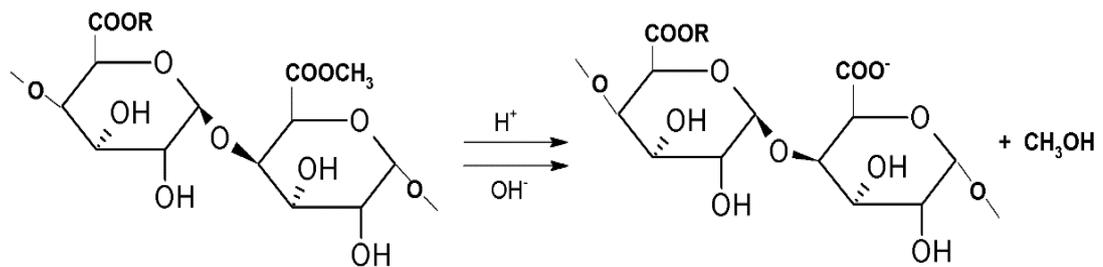
El primer mecanismo cuando sucede en un medio ácido (pH entre 1 a 3) y a temperaturas inferiores a 10 °C se denomina desesterificación donde ocurre la liberación de metanol y la formación de pectatos, y cuando ocurre en un medio alcalino se denomina saponificación obteniéndose una sal alcalina del ácido orgánico (jabón) y metanol.

El segundo mecanismo es por despolimerización (disminución del tamaño de la cadena polimérica) que puede ocurrir por hidrólisis (ácida o enzimática) de los enlaces  $\alpha$ -1,4 o por reacciones de  $\beta$ -eliminación.

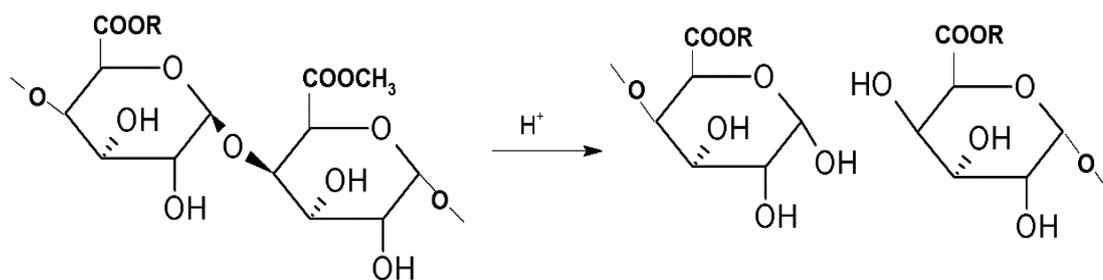
La hidrólisis ocurre en medio ácido a temperaturas superiores a 10 °C, la reacción sucede en los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 produciendo una ruptura de los mismos; en caso que las condiciones sean drásticas llega a afectar las características generales de la pectina.

La  $\beta$ -eliminación ocurre en medio alcalino, el hidrógeno que se encuentra presente en el C<sub>5</sub>, el más ácido en función al grupo éster metílico es atacado por el ion hidroxilo (OH<sup>-</sup>), resultando en la transferencia electrónica y ruptura de los enlaces glucosídicos para la formación del doble enlace entre C<sub>4</sub> y el C<sub>5</sub>. La

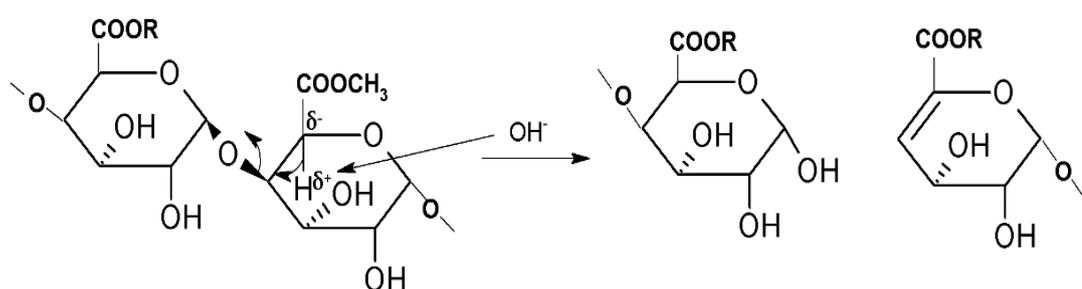
reacción puede ser acelerada por un aumento en la concentración del álcali, temperatura o por la presencia de iones tales como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , citrato, malato o fitato. A temperaturas inferiores a  $10\text{ }^\circ\text{C}$ , el grado de metilación de las pectinas disminuye notablemente impidiendo la aproximación de los iones hidroxilos, mediante la repulsión electrostática y la reacción no ocurre más.



**Desesterificación / Saponificación**



**Hidrólisis**



**$\beta$  - eliminación**

**Figura 9. Principales modificaciones en las sustancias pécticas**

Adaptada de Canteri (2012)<sup>19</sup>

Las sustancias pécticas son degradadas de igual forma por enzimas de origen vegetal o microbiano, la degradación puede seguir dos mecanismos: desmetilación preliminar por acción de la pectina-esterasa de origen vegetal, seguida por la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4 por las poligalacturonasas de origen vegetal; y la despolimerización directa por reacciones de  $\beta$ -eliminación bajo la acción de las pectina-liasas y pectato-liasas de origen microbiano<sup>19</sup>.

### 1.2.5. GRADO DE METOXILACIÓN DE LA PECTINA

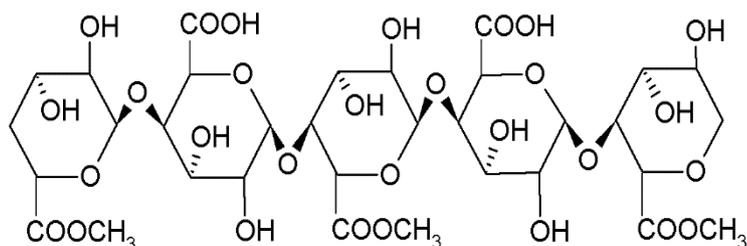
Wong citado por Telesca<sup>22</sup> menciona que el grado de metoxilación de la pectina es la relación de unidades de ácidos galacturónicos esterificados por unidad de ácido galacturónico total. La cantidad de grupos carboxílicos esterificados es expresada por el contenido de metoxilos, estos grupos ejercen un importante papel en la formación de geles siendo un parámetro para indicar las propiedades físicas o funcionales de las pectinas.

El grado de esterificación de la pectina depende directamente de la fuente y del método de extracción empleado. En general el contenido de metoxilo de las pectinas extraídas de los vegetales está comprendido entre 10% a 12% expuesto por Padival *et al.* citado por Telesca<sup>22</sup>.

#### i. Pectinas de alto metoxilo (HM)

Estas pectinas poseen la mayoría de los grupos carboxilo esterificados normalmente entre el 50% al 58%, (**Fig. 10**). Por lo tanto, la mayoría de grupos ácidos no están disponibles para formar enlaces cruzados con iones divalentes, estas pectinas no forman geles de esta manera.

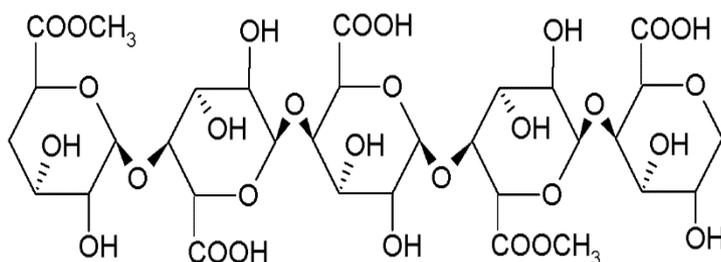
El grado de esterificación de las pectinas de alto metoxilo influye mucho sobre sus propiedades, en particular, a mayor grado de esterificación, mayor es la temperatura de gelificación. Son capaces de formar geles en condiciones de pH entre 2.8 y 3.5, además con un contenido de sólidos solubles (azúcar) entre 60% y 70%<sup>2</sup>.

**Figura 10. Pectinas de alto metoxilo**Suárez (2014)<sup>2</sup>**ii. Pectinas de bajo metoxilo (LM)**

Este tipo de pectinas como se muestra en la **Fig. 11**, poseen la mayoría de los grupos carboxilo libres. Son aquellas en las cuales menos del 50% de los grupos hidroxilo están esterificados con metanol, se estima que solo del 20% al 40% de los grupos carboxilo están esterificados. Por lo tanto, la mayoría están disponibles para formar enlaces cruzados con iones divalentes como el calcio<sup>2</sup>.

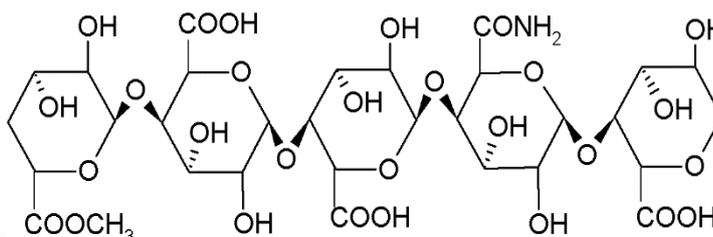
En este caso la formación del gel ocurre por la formación de enlaces entre los cationes con moléculas de pectina, formando una red tridimensional con los grupos carboxilo.

Los geles se pueden obtener entre pH 1 a 7; el pH no afecta la textura del gel ni el intervalo de sólidos solubles, el cual puede fluctuar entre 0% y 80%, pero la presencia de calcio (40 a 100 mg) es el factor predominante en la formación del gel.

**Figura 11. Pectina de bajo metoxilo**Suárez (2014)<sup>2</sup>

### iii. Pectinas de bajo metoxilo amidadas

Son pectinas de bajo índice metoxilo, que se obtienen a partir de pectinas de alto metoxilo mediante una desesterificación alcalina en presencia de amoníaco, por tanto, sus grupos metoxilo son sustituidos por una amida (**Fig. 12**).



**Figura 12. Pectina de bajo metoxilo amidada**

Suárez (2014)<sup>2</sup>

Estas pectinas se caracterizan en no requerir para gelificar la adición de calcio siendo suficiente el calcio presente en los frutos, además de que forman geles termoreversibles<sup>2</sup>.

### 1.3. APLICACIONES DE LA PECTINA

Woo citado por Sánchez<sup>23</sup> sugiere que, en estudios realizados acerca del consumo anual de pectina a nivel mundial es de 45 millones de kilogramos. En la actualidad la pectina es extraída de una diversa cantidad de fuentes como uvas, betarraga, residuos de manzana y cáscara de cítricos.

Los geles de pectina son importantes para crear o transformar las texturas de compotas, jaleas, salsas, mayonesas, confites; como en la industria láctea para la fabricación de yogures frutados y de productos lácteos bajos en grasa, en la industria de bebidas dietéticas para la preparación de refrescos; la pectina se usa largamente como componente funcional en la industria alimentaria y como una fuente de fibra dietética, por su habilidad para la formación de geles acuosos.

La pectina en los alimentos se emplea ampliamente como gelificante, así también agente de textura y como espesante en alimentos procesados y como

emulsionante y estabilizante en productos lácteos y helados, una de las aplicaciones más populares de la pectina es en la fabricación de mermeladas por su alto contenido de azúcar. En estudios recientes se han descritos las propiedades terapéuticas de la pectina en la reducción del colesterol e inducción de la apoptosis de células cancerígenas del colón, motivo por el cual se están aprovechando en el área farmacéutica<sup>23</sup>.

Las pectinas de alto metoxilo presentan diferentes cualidades empleadas para la estabilización de yogurts como, la preservación de productos lácteos de la incorporación de caseína al calentarse a pH inferiores a 4.3; también han sido relacionadas con el área farmacéutica, porque al ser ingerida reviste las paredes estomacales con una película gelificada que la protege de las hipersecreciones gástricas y biliares, dándole una aplicación en los tratamientos de gastritis y úlceras. Asimismo, en la pared intestinal su acción es semejante; debido al poder adsorbente de la macromolécula péctica, se le amplía una acción desintoxicante admitiendo la inhibición de toxinas<sup>16, 24</sup>.

La pectina tiene efectos beneficiosos en la salud por ello, tiene significativas aplicaciones tanto en la industria farmacéutica como en la industria cosmética, utilizada como una sustancia en las preparaciones farmacéuticas como antidiarreicos, desintoxicantes y algunas drogas son encapsuladas con una película de pectina para protegerla en la mucosa gástrica y así permitir que el componente activo sea liberado en la sangre.

Aparte de ello, la pectina reduce la intolerancia a la glucosa en los pacientes diabéticos e incluso reduce el nivel de colesterol sanguíneo y la fracción de lipoproteínas de baja densidad<sup>20</sup>.

Como uso no alimenticio, se le emplea en la producción de plásticos, como en la fabricación de productos espumantes, agentes de clarificación y aglutinantes y material para la absorción de contaminantes en efluentes industriales líquidos.

Actualmente se realizan estudios para la formación de películas biodegradables y comestibles en la conservación de diferentes frutas, así también como adhesivos, sustitutos de papel, espumas y plastificantes, materiales para implantes biomédicos y liberación de fármacos<sup>19</sup>.

## 1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA PECTINA

Las pectinas son compuestos que generalmente están presentes en alimentos, son extraídas del tejido vegetal empleando reactivos, disolventes y equipos que no dejan residuos tóxicos en el producto final<sup>23</sup>.

Schieber citado por Sánchez<sup>23</sup> consideró que, la utilización de los subproductos de la industria de los jugos es provechoso desde un punto de vista económico y ecológico en la producción de pectina.

Actualmente existen diversas técnicas en la extracción de pectina a partir de diferentes tejidos vegetales, procedimientos fisicoquímicos o enzimáticos. Usualmente se realizan pre-tratamientos al material vegetal para facilitar la extracción y así obtener un mayor rendimiento durante la extracción de las sustancias pécticas.

### 1.4.1. EXTRACCIÓN POR MÉTODO CONVENCIONAL

La extracción de las pectinas mediante los métodos convencionales se lleva a cabo a temperaturas cercanas a los 90 °C por una hora. Mediante la acidificación se puede extraer las pectinas de los desechos de diferentes frutos. En la industria se extraen a altas temperaturas para hidrolizar la protopectina usando ácidos como: sulfúrico, fosfórico, nítrico, clorhídrico o cítrico<sup>23</sup>.

Se ha determinado que la extracción de pectina mediante soluciones ácidas acuosas es suficiente para obtener la pectina que no sea sensible al calcio. Se emplea otra extracción para obtener la pectina restante usando ácidos fuertes, principalmente para aquellas sensibles al calcio<sup>22</sup>.

### 1.4.2. EXTRACCIÓN POR MÉTODOS FISICOQUÍMICOS

Para la extracción de la protopectina se han empleado dos métodos, el primero es mediante un agente quelante para remover los cationes que componen a los ácidos pécticos, y el segundo método es mediante ácidos para romper los puentes de hidrógeno entre la celulosa y los ácidos pécticos<sup>23</sup>.

El rendimiento de la pectina depende de las variables como la temperatura, el tiempo de extracción, el pH, los tipos de solventes de extracción y el uso de agentes quelantes, como: ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y el

ácido ciclo hexanodiamino tetracético (CDTA) para ayudar a la liberación de pectina de la pared celular<sup>23</sup>.

#### 1.4.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

Se han determinado nuevos métodos en los cuales la pectina puede extraerse en menores tiempos y con mejor calidad y rendimiento ya que el método convencional provoca la degradación térmica de proteínas, lo cual genera pérdidas de pectina extraída.

Se reportó que el calentamiento con microondas al material vegetal pre-tratado permitió incrementar el rendimiento de pectina durante su extracción<sup>23</sup>. Fishman<sup>25</sup> indica que, confirmaron el efecto favorable del pre-tratamiento con microondas durante la extracción de la pectina de cáscara de naranja.

Sánchez<sup>23</sup> expone que, el efecto del calentamiento se debe primero a la desintegración parcial del tejido vegetal, a hidrólisis de la protopectina y a la rápida inactivación de enzimas pectolíticas.

#### 1.4.4. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA

El método enzimático emplea pectinesterasa o pectinmetilesterasa, convirtiendo las pectinas de alto metoxilo en pectina de baja metoxilo sin ocurrir despolimerización de la misma.

En investigaciones realizadas por Correa citado por Sánchez<sup>23</sup> menciona que, empleó el método enzimático con pectinesterasa consiguiendo una pectina de bajo metoxilo que formó geles con una mejor resistencia que los obtenidos por vía química.

Mientras que Ptichkina citado por Sánchez<sup>23</sup> señala que, lograron pectinas de 53% de grado de esterificación en calabazas empleando enzimas de *Aspergillus awamori* degradando la celulosa y las sustancias insolubles de la pared vegetal.

## 1.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA PECTINA

### 1.5.1. PESO EQUIVALENTE

El peso equivalente de la pectina (PE)<sup>26</sup>, corresponde al número de unidades de ácido D-galacturónico contenido en la molécula y se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Peso equivalente} = \frac{1000 \times \text{peso de la muestra (g)}}{\text{Vol. Álcali} \times \text{Normalidad}}$$

El peso equivalente se usa para calcular el contenido de ácido anhidrogalacturónico y el grado de esterificación. Se determina por titulación con NaOH usando como indicador rojo fenol o indicador de Hinton<sup>27</sup>.

### 1.5.2. CONTENIDO DE METOXILO

Este indicador corresponde al número de grupos de metoxilos que se encuentran esterificando los grupos carboxílicos. Esto se logra saponificando la pectina y titulando el grupo carboxilo liberado.

El método para determinarlo se basa en la neutralización de los grupos carboxílicos con NaOH 0.1 N en presencia de indicador rojo de fenol, agregando un exceso medido de NaOH 0.25 N, para saponificar los grupos  $-\text{COOCH}_3$  que pasan a  $-\text{COONa}$  y finalmente titular el exceso de NaOH<sup>27</sup>. El porcentaje de metilación se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Metoxilo} = \frac{\text{mL Álcali} \times \text{Normalidad} \times 3.1}{\text{Peso de nuestra (g)}}$$

$$1\text{mL de NaOH } 0.1 \text{ N} = 3.1\text{mg de } -\text{OCH}_3$$

Según Owens<sup>27</sup>, el contenido de metoxilo es un factor importante en el control del tiempo de formación de las pectinas y de la sensibilidad a cationes polivalentes.

### 1.5.3. CONTENIDO DE ÁCIDO ANHIDROGALACTURÓNICO

La pectina la cual está parcialmente esterificada con ácido poligalacturónico, contiene 10% o más de materia orgánica, compuesta por arabinosa, galactosa y otros azúcares<sup>28</sup>.

La estimación del contenido de ácido anhidrogalacturónico es esencial para determinar la pureza y grado de esterificación para evaluar las propiedades físicas.

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

Donde:

176 = Peso molecular del ácido anhidrogalacturónico

meq = Miliequivalentes

AAG = Ácido anhidrogalacturónico

### 1.5.4. GRADO DE ESTERIFICACIÓN

El grado de esterificación (GE) de la pectina es el porcentaje de los grupos carboxilos totales del ácido anhidrogalacturónico que son esterificados con metanol; según menciona Lozada<sup>28</sup>.

Desde que las propiedades de los ácidos pectínicos son dependientes en su mayor parte de su grado de esterificación, se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ G.E.} = \frac{176 \times \text{CH}_3\text{O}\%}{31 \times \text{AAG}\%} \times 100$$

Dónde:

176 = Peso molecular del ácido anhidrogalacturónico

31 = Peso molecular del grupo metoxilo

El GE puede ser mayor o menor a 50. Si GE es mayor a 50, se consideran con alto grado de metilación y si es menor a 50 se considera con bajo grado de metilación.

### 1.5.5. PESO MOLECULAR

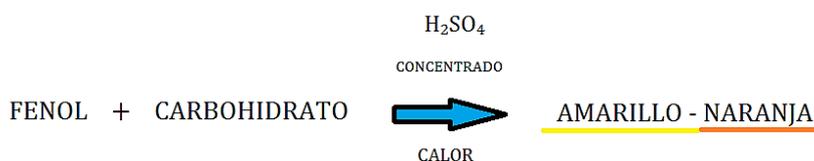
Los pesos moleculares de las pectinas y su distribución han sido estudiados mediante viscosimetría, determinando que los pesos moleculares variaban de 20 000 a 300 000 g/mol.

El peso molecular de la pectina está relacionado con la longitud de la cadena, es una característica muy importante de la que dependen la viscosidad de sus disoluciones y su comportamiento en la gelificación o formación de las jaleas, mencionado por Baltazar<sup>24</sup>.

## 1.6. COMPOSICIÓN DE LA PECTINA

### 1.6.1. MÉTODO DE CARBOHIDRATOS TOTALES POR DUBOIS

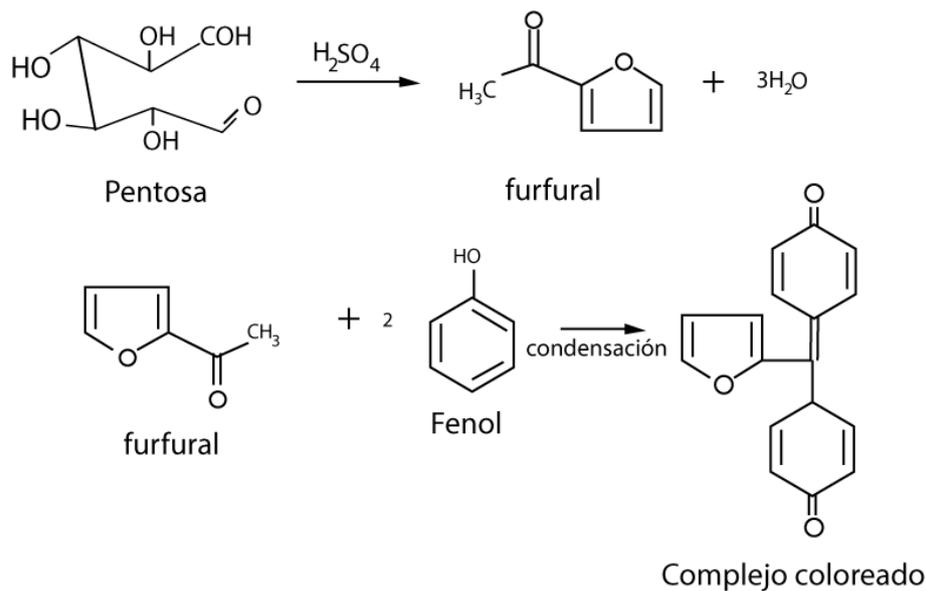
Este método espectrofotométrico UV-visible propuesto por Dubois en 1956 se fundamenta en que los azúcares se deshidratan al reaccionar con ácidos fuertes llegando a una temperatura de 115 °C a 118 °C originando furfurales, que se condensan cuando reaccionan con fenol dando un compuesto de color amarillo-naranja muy estable, el cual varía su intensidad proporcionalmente a la cantidad total de azúcares presentes (**Fig. 13**).



**Figura 13. Reacción del fenol - ácido sulfúrico**

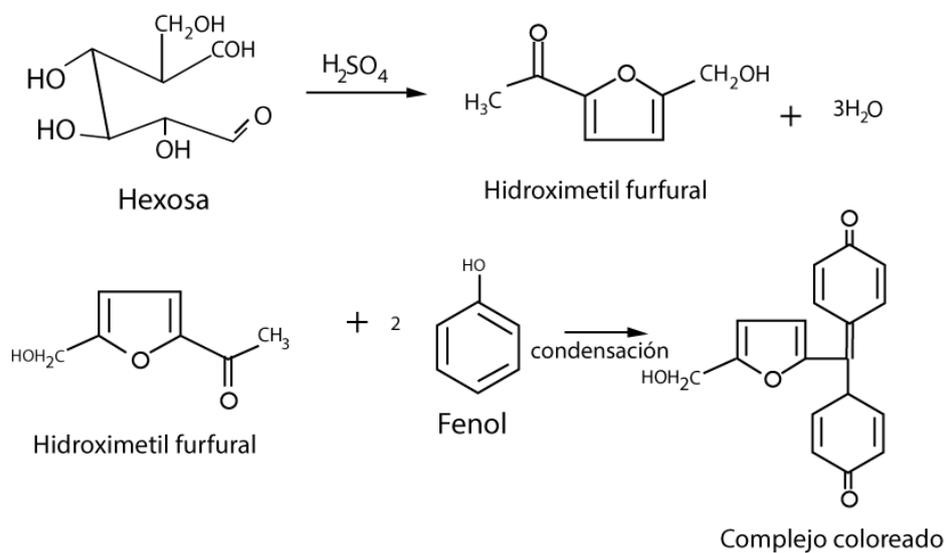
Adaptada de Capelo (2011)<sup>29</sup>

Los compuestos coloridos formados son aquellos que van a ser cuantificados (método colorimétrico). Por medio de este método, se determinan azúcares totales que presentarán un color amarillo-naranja muy estable luego de que han reaccionado con el fenol en presencia de ácido sulfúrico concentrado<sup>29</sup>, como se muestra en la **Fig. 14** y en la **Fig. 15**.



**Figura 14. Reacción de deshidratación y condensación de pentosas**

Suárez (2014)<sup>2</sup>



**Figura 15. Reacción de deshidratación y condensación de hexosas**

Suárez (2014)<sup>2</sup>

### 1.6.2. MÉTODO DE FENOLES TOTALES POR FOLIN CIOCALTEU

Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos producido por un reactivo del mismo nombre.

El reactivo de Folin Ciocalteu está constituido por una mezcla de ácido fosfowolfrámico o fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), se reducen estos complejos por la oxidación de los fenoles existentes a óxidos de wolframio o tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), los cuales son cromógenos de color azul intenso siendo proporcionales a la cantidad de grupos fenólicos presentes<sup>30</sup>.

La coloración azul producida, posee una absorción máxima en torno a 750 nm, por lo que se deduce que dicha absorbancia será proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos presentes en la muestra.

Reactivo de Folin ( $W^{6+}$ ,  $Mo^{6+}$ ) color amarillo



Reactivo de Folin ( $W^{5+}$ ,  $Mo^{5+}$ ) color azul

**Figura 16. Reacción del reactivo de Folin**

**Jiménez (2012-2013)<sup>32</sup>**

Debido a que el ácido gálico ha sido a menudo considerado como producto estándar en la determinación, los resultados obtenidos llevarán asociadas las unidades de mg/L de ácido gálico<sup>31</sup>. En la **Fig. 16**, se observa el mecanismo de reacción del Reactivo de Folin.

### 1.7. INMOVILIZACIÓN

El término inmovilización se refiere a las células, microorganismos y enzimas<sup>33</sup> que se encuentran físicamente contenidas en una región con sus propiedades, asimismo es una técnica que permite su uso continuo.

Sus principales ventajas es facilitar el manejo de una mayor densidad celular en comparación con los métodos usuales y un mejor control de los sistemas de recuperación de la biomasa para una posterior utilización<sup>34</sup>.

### 1.7.1. ENCAPSULACIÓN

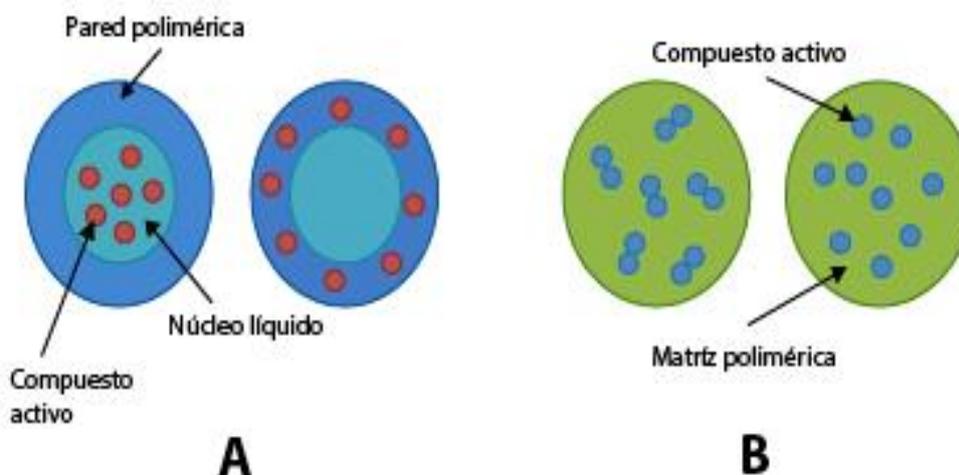
La encapsulación ha sido definida como la tecnología mediante la cual se logra confinar compuestos activos dentro de una matriz polimérica. López<sup>35</sup> menciona que, esta técnica crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior.

Las principales aplicaciones de la técnica de encapsulación en la industria de alimentos son:

- o Proteger el compuesto activo de la degradación producida por el ambiente (calor, aire, luz, humedad).
- o Liberación controlada del compuesto activo desde la matriz encapsulante bajo condiciones específicas (pH, temperatura).
- o Modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipulación. Por ejemplo, reducir la higroscopicidad, modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo, entre otros.
- o Separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen.

El producto resultante de la encapsulación ha recibido diferentes denominaciones que atienden a su morfología y estructura interna, existiendo como factor común el tamaño.

Esquivel<sup>36</sup> comenta que, las cápsulas son sistemas vesiculares en los cuales el activo esta conferido en una cavidad o núcleo rodeado por una membrana polimérica, mientras que las esferas son sistemas matriciales en los cuales el bioactivo se encuentra incrustado en la matriz polimérica de manera uniforme. En la **Fig. 17** se representan los tipos de partículas poliméricas.



**Figura 17. Representación esquemática de dos tipos de partículas poliméricas: A. Cápsula B. Esfera. Adaptada de Esquivel (2013)<sup>36</sup>**

Existen diversos métodos para la producción de encapsulados los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: métodos físicos y métodos fisicoquímicos.

La selección del proceso de encapsulación adecuado dependerá de múltiples factores, tales como: el tamaño partícula requerido, las propiedades fisicoquímicas del material encapsulante y el compuesto activo, la finalidad del producto encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo<sup>35</sup>, ver la **Tabla 4.**

**Tabla 4. Clasificación de las técnicas de encapsulación<sup>35</sup>**

MÉTODOS FÍSICOS	MÉTODOS FISICOQUÍMICOS
Secado en spray Enfriamiento por spray Recubrimiento por lecho fluidizado Extrusión Co-cristalización	Liposomas Coacervación Gelificación iónica Complejos de inclusión

### 1.7.2. GELIFICACIÓN IÓNICA

La gelificación iónica se basa en la capacidad de los polisacáridos aniónicos, como la pectina y el alginato, de formar geles en presencia de iones como el calcio. Los mecanismos de gelificación iónica para la formación de cápsulas se han realizado principalmente por dos procesos, siendo éstos la gelificación interna y la externa.

El proceso de formación de gel se inicia a partir de una solución de polisacárido y una fuente de iones divalentes como el calcio, externa o interna, que se difunde a la cadena del biopolímero; como resultado de la complejidad ocurre el cambio estructural, produciendo una matriz sólida, con características de un gel<sup>37</sup>.

#### a. Gelificación iónica externa

Para la obtención de cápsulas utilizando gelificación iónica externa, una solución de biopolímero conteniendo el material de interés es goteada sobre una solución iónica en concentraciones adecuadas pudiéndose obtener niveles razonables del activo encapsulado y cápsulas de diferentes formas y tamaños. Las interacciones de los iones con los grupos carboxilato de los polisacáridos resultan en la formación de geles insolubles.

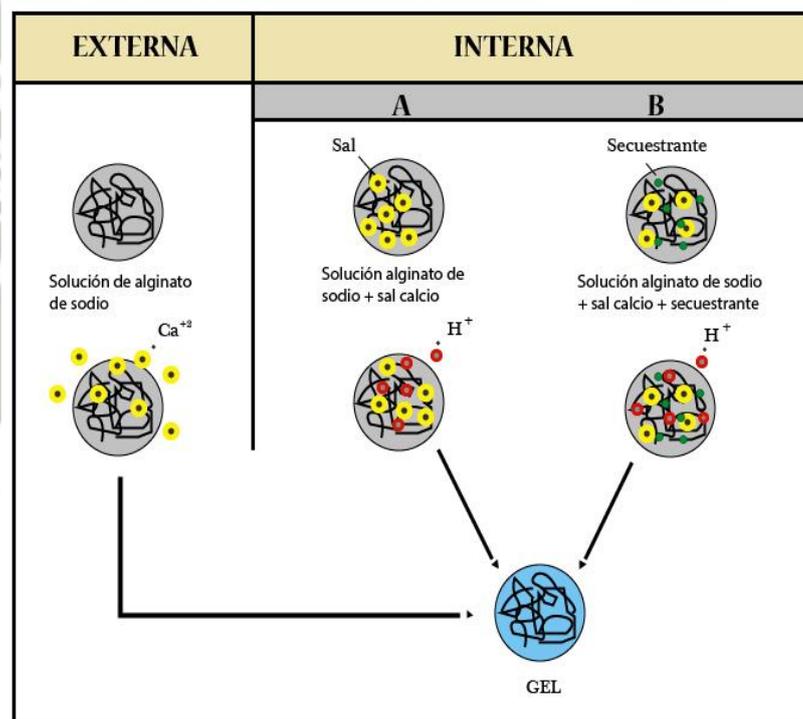
El endurecimiento de las partículas ocurre en intervalos mínimos de tiempo, comenzando en la superficie en la cual los iones divalentes reaccionan con las cadenas biopoliméricas cargadas negativamente, formando una estructura tridimensional rígida, con alto contenido de agua, la cual es utilizada por los iones para difundirse en el interior de la partícula, favoreciendo la reticulación desde el exterior hacia el interior<sup>37</sup>.

#### b. Gelificación Iónica interna

El proceso de gelificación iónica interna implica la liberación de los iones calcio a partir de una fuente interna de una sal de calcio que es insoluble en la solución del polisacárido.

Un ácido orgánico se añade a la solución para la acidificación del medio, que permite solubilizar los iones de calcio. A medida que el ácido penetra en la fase acuosa, reacciona con la sal de calcio y libera los iones, resultando en la formación de la matriz del gel<sup>37</sup>.

La principal diferencia entre la gelificación externa e interna es la cinética del proceso, como se muestra en la **Fig. 18** mencionado por Lupo<sup>37</sup>. Si el objetivo es controlar la transición sol-gel, en el proceso de gelificación externa los factores a manipular son la concentración de calcio y la composición del biopolímero, mientras que para el proceso de gelificación interna los factores a considerar son la solubilidad y concentración del producto, sal de calcio y la concentración del ácido orgánico<sup>37</sup>.



**Figura 18. Mecanismos de gelificación iónica: (A) Sal insoluble (B) Sal parcialmente soluble. Adaptada de Lupo (2012)<sup>38</sup>**

Patil citado por Tello<sup>37</sup> indica que la gelificación iónica es un proceso simple, que no requiere el uso de disolventes orgánicos ni de temperatura o pH extremos, lo que resulta de bajo costo en comparación con otras técnicas.

Igualmente, la gelificación iónica permite encapsular sustancias hidrofílicas o hidrofóbicas. Por otro lado, a pesar de que las partículas de gelificación iónica son adecuadas para la encapsulación, estas son sensibles a valores de pH extremos, su principal diferencial es la porosidad de la matriz, la cual determina la liberación de la sustancia encapsulada.

Para superar esta limitación se puede modificar la estructura del gel, a partir de la combinación de diferentes tipos de biopolímeros, para garantizar el aprovechamiento de las ventajas de la composición química de cada compuesto o por la complejidad con polielectrolitos catiónicos como las proteínas<sup>37</sup>.

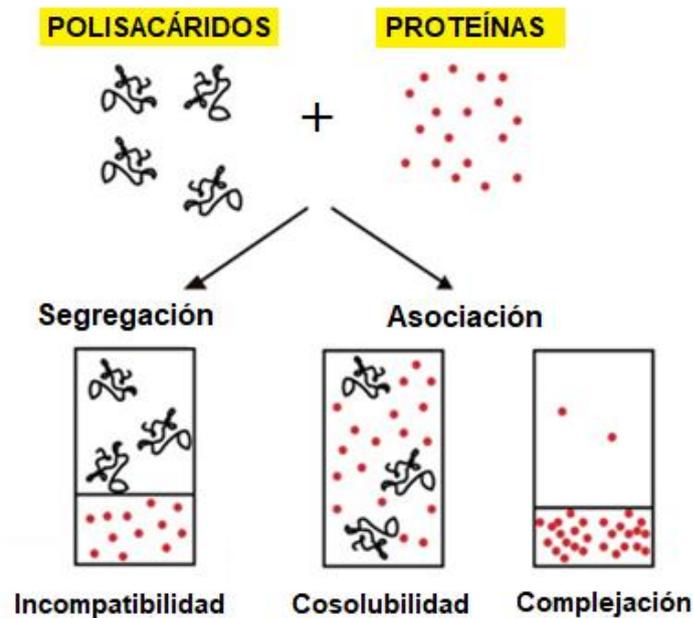
### 1.7.3. INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNA Y POLISACÁRIDO

Las proteínas y los polisacáridos se clasifican como biopolímeros, los cuales son encontrados con gran frecuencia en estructuras fundamentales que componen diferentes organismos vivos. Una gran variedad de productos alimenticios tiene en su composición ingredientes como proteínas y polisacáridos.

La interacción entre proteína y polisacárido ejerce influencia directa sobre las propiedades macroscópicas de los alimentos, tales como fluidez, estabilidad y textura.

Tolstoguzov y Schmitt citados por Bonini<sup>39</sup> mencionan que la mezcla de biopolímero es en su mayoría inestable ya que son susceptibles al fenómeno de separación de fases. Cuando las proteínas y los polisacáridos se mezclan, tres diferentes escenarios son posibles, ver en la **Fig. 19**.

- o *Incompatibilidad termodinámica*; conocida como separación de fase segregativa, las moléculas se repelen entre sí y se forman dos fases, una fase concentrada en polisacáridos y otra fase en proteínas.
- o *Cosolubilidad*; cuando ambas moléculas presentan cargas negativas.
- o *Complejación*; conocida como separación de fase asociativa, las moléculas se atraen mutuamente (cuando los dos polímeros presentan grupos funcionales cargados con cargas opuestas) y forman una fase concentrada y una fase diluida.



**Figura 19. Principales comportamientos de las mezclas de proteínas: polisacáridos. Adaptada de Tello (2007)<sup>37</sup>**

La separación de fase asociativa o coacervación compleja ocurre generalmente en concentraciones relativamente pequeñas, bajas fuerzas iónicas y cuando ambos biopolímeros presentan cargas opuestas. Por lo tanto, la atracción electrostática entre los biopolímeros ocurre a un pH entre el punto isoelectrónico (pI) de la proteína y el pKa del polisacárido. Los complejos de proteínas y polisacáridos se forman espontáneamente en una solución acuosa por interacción electrostática entre los grupos de cargas opuestas de los biopolímeros.

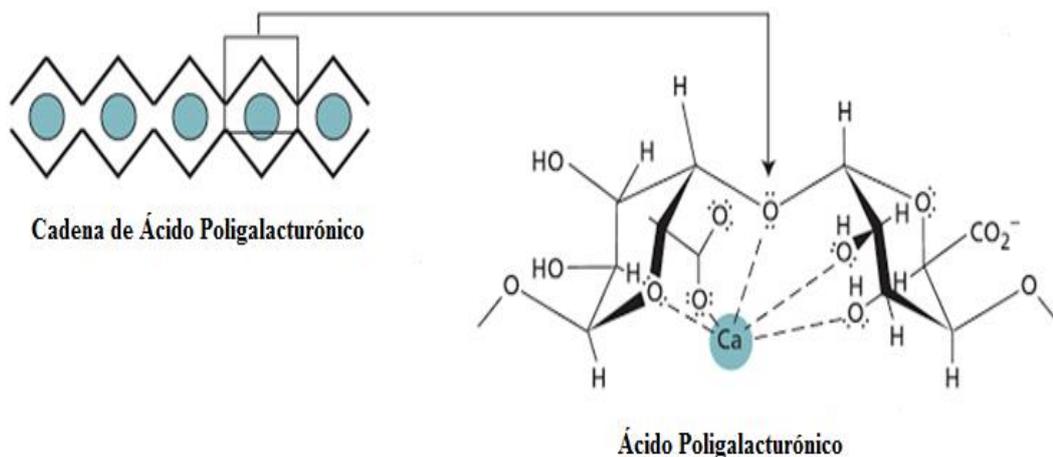
La formación de los complejos es influenciada por las características de los biopolímeros como densidad de carga, masa molar, concentración, naturaleza química y estequiometría, así como por condiciones ambientales como pH, fuerza iónica y tipo de ion. Los complejos resultantes de las interacciones entre proteínas y polisacáridos pueden ser solubles o insolubles, formando dos fases, una conteniendo alta concentración del complejo biopolimérico y la otra relativamente libre de complejo<sup>37</sup>.

#### 1.7.4. MODELO DE LA CAJA DE HUEVOS

Las pectinas y los alginatos son polisacáridos iónicos naturales, el amplio uso de estos polímeros es derivado por su habilidad de formar geles en presencia de cationes divalentes, diversos estudios fisicoquímicos han sido realizados a fin de obtener información respecto a los mecanismos y las características involucradas en el proceso de gelificación<sup>40</sup>.

El modelo para la zona de unión de las cadenas es denominado modelo de la caja de huevo, Barrera citado por Telesca<sup>22</sup> describe la caja de huevo como el modelo que representa las zonas de unión en geles de pectinas de baja metoxilación, como consecuencia de los iones divalentes como los iones calcio y los grupos carboxilos de las diferentes cadenas de pectina, promoviendo así la formación de una red.

En la **Fig. 20**, se aprecia la interacción del ácido poligalacturónico, principal constituyente de las pectinas y de los iones calcio, asimismo se observa de forma aumentada la formación de un enlace covalente coordinado entre un único ion calcio y los oxígenos de los hidroxilos de los residuos del ácido galacturónico; formando así los iones calcio complejos o compuestos coordinados de valencia con el ácido poligalacturónico<sup>21</sup>.



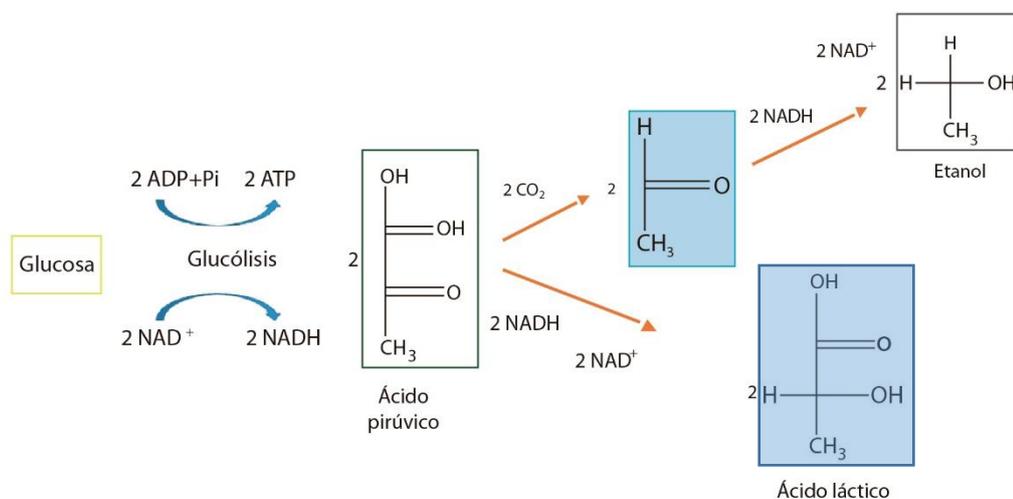
**Figura 20. Modelo de la caja de huevos (egg-box)**

Adaptada de Taiz (2017)<sup>21</sup>

## 1.8. FERMENTACIÓN

El químico francés Louis Pasteur descubrió la fermentación, es un proceso de obtención de energía que ocurre sin la presencia de oxígeno, por lo que es una vía de producción de energía anaerobia.

El proceso de fermentación ocurre en el citosol y se inicia con la glucólisis, cuando ocurre la ruptura de la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual recibe electrones  $H^+$  provenientes del NADH y se transforma en ácido láctico, que luego es eliminado por la célula, como se muestra en **Fig. 21**.



**Figura 21. Proceso de fermentación ocurrido en el citosol**

*Adaptada de Mundo Educação<sup>41</sup>*

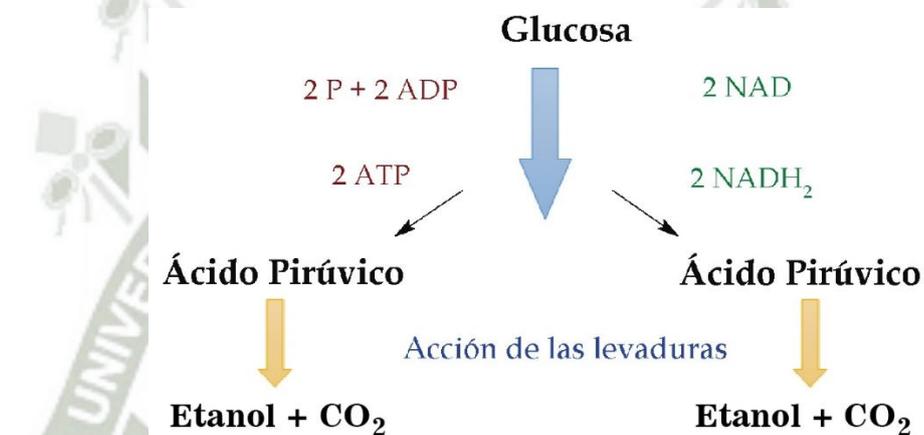
Cuando el piruvato se transforma en ácido láctico, se produce una fermentación láctica; y cuando se transforma en alcohol, es una fermentación alcohólica. Tanto en la fermentación alcohólica como en la láctica el NADH dona sus electrones y se convierte en  $NAD^+$ <sup>41</sup>.

Los tipos de fermentación que existen se muestran a continuación:

- Fermentación homoláctica: se produce solo ácido láctico.
- Fermentación heteroláctica: se produce ácido láctico, etanol y  $CO_2$ .
- Fermentación ácida mixta: se produce etanol, ácido acético, fórmico,  $CO_2$  e  $H_2$ .
- Fermentación alcohólica: se produce solo etanol.

### 1.8.1. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es realizada por algunos tipos de bacterias y principalmente por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras realizan la respiración en presencia de oxígeno, crecen y oxidan completamente la glucosa obteniendo ATP, en condiciones de anaerobiosis, fermentan los azúcares presentes, como la glucosa transformándola en ácido pirúvico. El ácido pirúvico es descarboxilado, generando acetaldehído por medio de la acción de la enzima piruvato descarboxilasa, el NADH produce la reducción del acetaldehído a moléculas de etanol ( $C_2H_5OH$ ) por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa, produciendo a su vez dióxido de carbono ( $CO_2$ )<sup>42</sup>.



**Figura 22. Proceso de la fermentación alcohólica**

**Adaptada de Brasil Escola<sup>42</sup>**

En la **Fig. 22** se muestra el proceso de fermentación alcohólica mediante la acción de las levaduras. La fermentación alcohólica es un proceso biológico ampliamente usado en la industria; es empleada en la elaboración de diferentes productos alimenticios como: pan, vino, cerveza, chocolate y diferentes bebidas fermentadas<sup>43, 44</sup>.

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1. MATERIALES**

##### **2.1.1. MATERIAL VEGETAL EMPLEADO**

Se utilizó cascarilla de cacao posiblemente de la variedad nativa “Chuncho”, originaria de la ciudad del Cusco – Quillabamba, adquirida en una tienda de especerías “Mas Ventas” en Arequipa. Se conservó a temperatura ambiente en bolsas Zipploc.

##### **2.1.2. INSUMOS**

- Gelatina sin sabor a granel, adquirida en una tienda de especerías “Mas Ventas” en Arequipa.
- Manzanas rojas variedad Delicia.
- Azúcar rubia Chucarapi.
- Levadura seca instantánea Fleischmann.

##### **2.1.3. MATERIALES DE LABORATORIO**

- Bagueta
- Embudo

- Fiolas de 5, 10, 100 mL
- Frascos ISO Tampón azul 1000 mL
- Matraz Erlenmeyer 250, 500, 1000 mL
- Micropipeta
- Mortero
- Pipetas graduadas de 1, 5, 10 mL
- Placas Petri
- Probeta graduada 100 mL
- Termómetro 0 – 100 °C
- Tubos Falcon
- Vaso precipitado 100, 1000 mL

#### 2.1.4. REACTIVOS QUÍMICOS

- Acetato de sodio (MERCK)
- Ácido acético (JT BAKER)
- Ácido cítrico (DIPROQUIM)
- Ácido clorhídrico (MERCK)
- Ácido gálico (RIEDEL)
- Ácido sulfúrico (MERCK)
- Alcohol etílico de 96° (DIPROQUIM)
- Carbonato de sodio (MERCK)
- Citrato de sodio (MOVILAB)
- Cloruro de calcio (SPECTRUM)
- Cloruro de sodio (MOVILAB)
- Éter de petróleo (JT BAKER)
- Fenol (DELTA QUÍMICA)
- Folin Ciocalteu (MERCK)
- Fosfato de sodio dibásico (MOVILAB)
- Fosfato de sodio monobásico (MOVILAB)
- Glicerina
- Glucosa
- Hidróxido de sodio (MERCK)

- Indicador rojo fenol (ALDRICH)
- Metanol (MERCK)
- Sulfato de zinc (DELTA QUÍMICA)

### 2.1.5. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Autoclave vertical (KESSEL)
- Balanza analítica (OHAUS)
- Baño maría (MEMMERT)
- Centrífuga de 12 tubos (FISHER CENTRAL)
- Desecador
- Equipo de extracción soxhlet (NORMAX)
- Equipo de reflujo (NORMAX)
- Espectrofotómetro (SHIMADZU UV/VIS)
- Estufa (MEMMERT)
- Hot plate (BIOSAN)
- Licuadora (OSTER)
- Refractómetro manual (INDEX)
- Sonicador (SELECTA)
- Vernier de 12 cm metal (LITZ)

### 2.1.6. OTROS MATERIALES

- Recipientes de vidrio de 500 mL
- Cintas pH 1-14
- Cocina eléctrica
- Gradilla
- Mallas de asbesto
- Mangueras de venoclisis
- Papel filtro
- Pinzas
- Propipeta
- Soporte universal

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. PROCESO DE OBTENCIÓN DE LA PECTINA

#### 2.2.1.1. Inactivación de las enzimas pécticas

La cascarilla de cacao se sumergió en agua corriente, en una relación de 300 g por litro y se llevó a ebullición a una temperatura de 92 °C durante 15 minutos; con el propósito de inactivar las enzimas pectinesterasas. Mediante una gasa se separó la cascarilla de cacao del agua y se procedió a colocarla en bandejas para un mejor secado.

#### 2.2.1.2. Lavado de la cascarilla de Cacao

La cascarilla de cacao seca se sumergió en alcohol etílico de 96° durante 24 horas para separar los fenoles; finalmente la cascarilla fue colocada en una estufa a una temperatura de 60 °C hasta estar completamente seca.

#### 2.2.1.3. Molienda de la cascarilla de Cacao

La cascarilla de cacao seca fue pulverizada usando un molino con aspas de acero hasta que se obtuvo un tamaño uniforme, luego fue pesada y se conservó en un frasco hermético.

#### 2.2.1.4. Desengrase de la cascarilla de Cacao

La cascarilla de cacao molida se colocó dentro de un cartucho de papel filtro en un equipo soxhlet; fue sometida a un desengrase por medio del solvente éter de petróleo. Se utilizó una relación 1:10 de muestra: solvente durante dos horas para eliminar la grasa presente, luego la cascarilla se secó a temperatura ambiente hasta que el solvente se evaporó.

#### 2.2.1.5. Hidrólisis

La cascarilla desengrasada fue sometida a un proceso de hidrólisis, en el cual se comparó el método convencional usando una solución acidulada (ácido sulfúrico) a un pH 1.5 y el método de ácido

cítrico a una concentración de 0.3% y un pH 3.0. Se realizó en un equipo de reflujo con agitación a 2500 rpm; se utilizó una relación 1:25 de muestra: solución, variando tiempo y temperatura como se muestra en la **Tabla 5**.

**Tabla 5. Métodos empleados durante el proceso de hidrólisis**

Método	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Convencional	1.5	90	60
Ácido Cítrico	3.0	90	75
			100
		75	75
			100

Las soluciones hidrolizadas obtenidas se enfriaron en un baño de hielo durante 30 minutos; posteriormente fueron llevadas a centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos para la separación de las fases obteniéndose: bagazo y las soluciones pécticas las cuales fueron recolectadas en diferentes frascos de vidrio estériles.

#### **2.2.1.6. Precipitación de la pectina**

A las soluciones pécticas obtenidas se le adicionaron etanol absoluto, en una relación 1:2 de muestra: etanol, se dejaron en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente para la precipitación.

#### **2.2.1.7. Purificación y secado de la pectina**

Las pectinas obtenidas fueron sometidas a dos lavados con etanol absoluto en relación 1:1, seguido de una centrifugación por 15 minutos a 2500 rpm. Posteriormente se decantó el exceso de etanol presente, las pectinas fueron colocadas en placas Petri y llevadas a un desecador por 24 horas.

## 2.2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA PECTINA

### 2.2.2.1. Determinación del Peso equivalente

Se pesó 500 mg de pectina, luego se humedeció con 2 mL de etanol absoluto y se agregó 1 g de Cloruro de sodio. Posteriormente se añadió un volumen de 100 mL de agua destilada y 6 gotas del indicador rojo fenol, se agitó y se verificó que la pectina se haya disuelto completamente observándose un color amarillo.

La solución obtenida fue titulada lentamente con NaOH 0.1 N, hasta virar a púrpura rojizo, se aplicó la metodología de Owens<sup>27</sup>.

### 2.2.2.2. Determinación del Contenido de metoxilo

A la solución anterior se le agregó 25 mL de NaOH 0.25 N después se agitó vigorosamente dejándose en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 25 mL de HCl 0.25 N.

Luego de agitar, se tituló con NaOH 0.1 N, tomando como punto final de la titulación un pH 7.5 o un color púrpura rojizo durante 20 segundos, según la metodología de Owens<sup>27</sup>.

### 2.2.2.3. Determinación de Ácido anhidrogalacturónico

Con los datos obtenidos del peso equivalente y el contenido de metoxilo, se calculó el porcentaje de ácido anhidrogalacturónico, según la metodología de Owens<sup>27</sup>.

### 2.2.2.4. Determinación del Grado de esterificación

Empleando los resultados del contenido de metoxilo y del ácido anhidrogalacturónico, se calculó el grado de esterificación, según la técnica de Shultz, mencionada por Lozada<sup>28</sup>.

### 2.2.3. COMPOSICIÓN DE LA PECTINA

Los métodos empleados para determinar tanto los carbohidratos totales como los fenoles totales se realizaron a la muestra de pectina seleccionada.

#### 2.2.3.1. Determinación de carbohidratos totales por el método de Dubois modificado por Rao

##### a. Curva de calibración

Se preparó una solución stock de glucosa a 1000 ppm de la cual se prepararon 5 soluciones patrón. El volumen final de las soluciones patrón y del blanco fue de 1 mL como se muestra en la **Tabla 6**, se agregó 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a cada una de ellas y luego fueron enfriadas en agua con hielo durante 2 minutos (15 °C a 20 °C).

Posteriormente se adicionó 600 µL de fenol 5% se mezcló, y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente, finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda 492 nm; se aplicó la metodología de Dubois<sup>45</sup> modificada de Rao<sup>46</sup>.

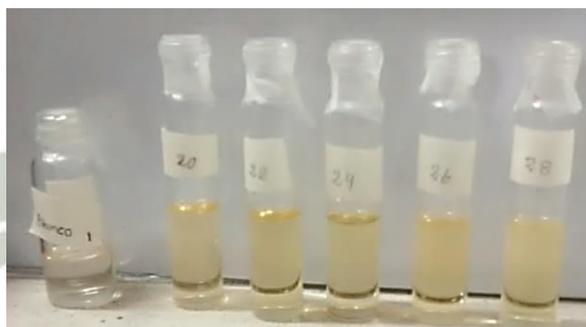
**Tabla 6. Soluciones patrón de Dubois para la curva de calibración**

	Glucosa (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	Fenol 5% (µL)
Blanco	0	1000	3.0	600
20 ppm	20	980	3.0	600
22 ppm	22	978	3.0	600
24 ppm	24	976	3.0	600
26 ppm	26	974	3.0	600
28 ppm	28	972	3.0	600

### b. Análisis de la pectina

Se pesó 50 mg de pectina, se adicionó 10 mL de agua destilada y se llevó al sonicador durante 10 a 15 segundos, a esta solución se le agregó 0.5 mL de Sulfato de zinc 10% y se añadió 0.5 mL de NaOH 0.5 N.

Posteriormente se dejó en reposo durante 15 minutos, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, se empleó la técnica de Suárez<sup>2</sup>.



**Figura 23. Soluciones patrón de Dubois**

Se utilizó 1 mL de la muestra ya tratada, se agregó 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se adicionó 600 µL de fenol 5% se agitó y dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se realizó la lectura, como se muestra en la **Fig. 23**.

### 2.2.3.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu

#### a. Curva de calibración

Se preparó una solución stock de 100 ppm de ácido gálico, de la cual se prepararon 5 soluciones patrón. El volumen final de las soluciones patrón y del blanco fue de 1 mL como se muestra en la **Tabla 7**, luego se adicionó 500 µL de Reactivo de Folin Ciocalteu a cada una de ellas y se esperó por un tiempo de 5 minutos.

Posteriormente se añadió 1500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, se incubó durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente y, finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

**Tabla 7. Soluciones patrón de Folin para la curva de calibración**

	Ácido Gálico ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo Folin Ciocalteu ( $\mu\text{L}$ )	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	0	1000	500	1500
2 ppm	20	980	500	1500
4 ppm	40	960	500	1500
6 ppm	60	940	500	1500
8 ppm	80	920	500	1500
10 ppm	100	900	500	1500

**b. Análisis de la pectina**

Se pesó 0.1 g de pectina y se adicionó 5 mL de metanol al 80%, luego se sometió a sonicación durante 15 minutos en oscuridad, para en seguida ser centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos.

Se recogió el sobrenadante por medio de una micropipeta y fue llevado a una fiola de 10 mL, se repitió el proceso una vez más para obtener un volumen total de 10 mL; se empleó la técnica de García<sup>47</sup>.

Se empleó 1 mL de la muestra ya tratada, se procedió a agregar el reactivo de Folin Ciocalteu 500  $\mu\text{L}$ , finalmente se añadió 1500  $\mu\text{L}$  de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, se incubó durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente y se realizó la lectura.

**2.2.4. INMOVILIZACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*****2.2.4.1. Activación de *Saccharomyces cerevisiae***

La levadura seca instantánea “Fleischmann” *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizada para este proceso, empleándose 1 g de levadura para 10 mL de mosto de manzana a temperatura ambiente (24 °C), la cual fue mezclada vigorosamente.

Se dejó en reposo 5 minutos posteriormente se usó 1 mL de la solución para la formación de pellets.

#### 2.2.4.2. Formación de pellets

Se empleó el método de gelificación iónica para la formación de pellets, los cuales son esferas que forman una matriz polimérica para la inmovilización de levaduras. Por ello se realizaron ensayos con diferentes porcentajes de pectina y gelatina, como se muestra en la

**Tabla 8.**

**Tabla 8. Porcentajes de pectina - gelatina para la formación de pellets**

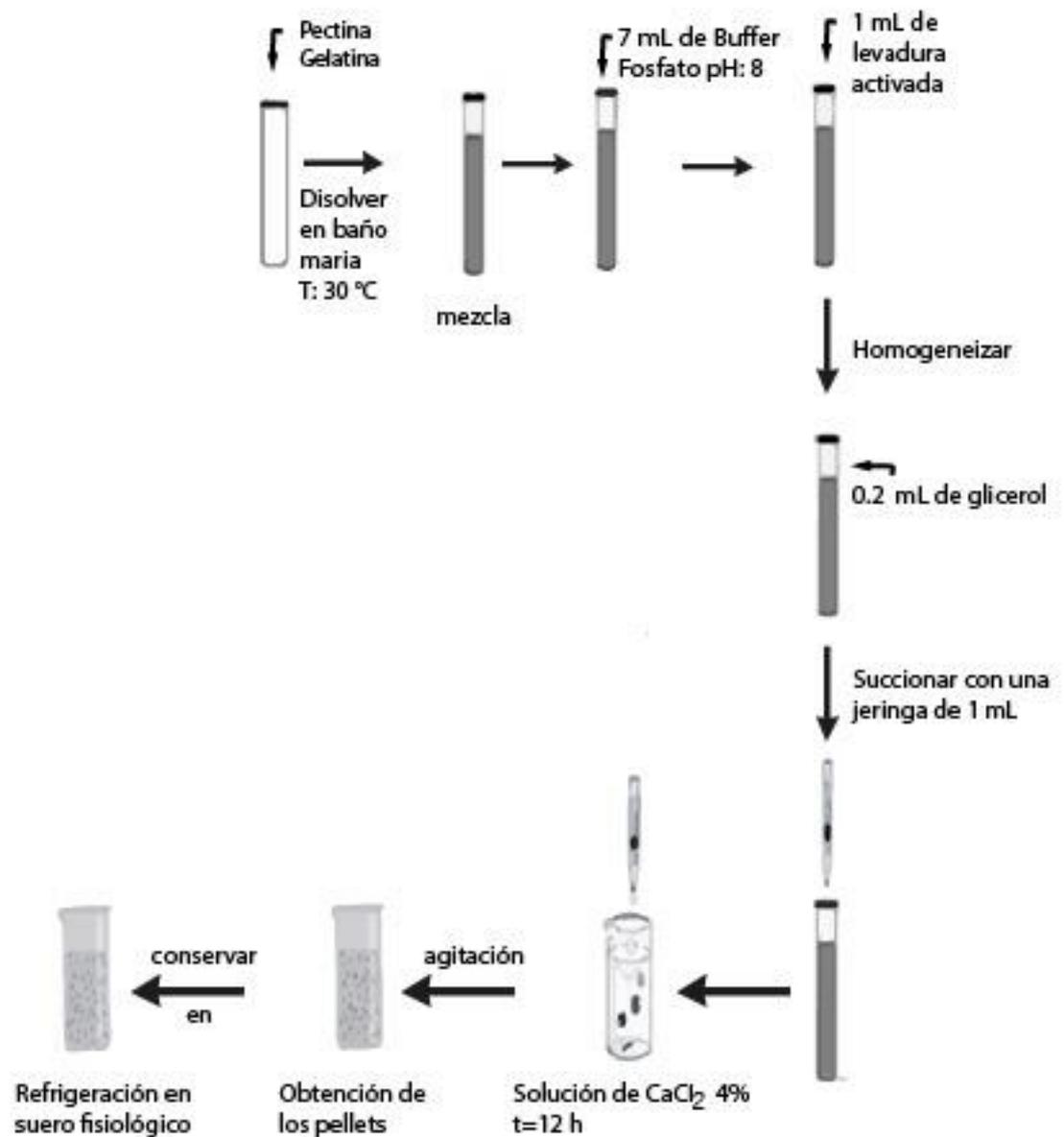
N° de Ensayos	Pectina (%)	Gelatina (%)
1	100	0
2	95	5
3	85	15
4	75	25
5	65	35
6	50	50

La gelatina que se usó fue comprada de la especería “Más Ventas” a granel, incolora. Se pesaron pectina y gelatina para disolverlos en Buffer Fosfato pH 8.0 en baño maría a una temperatura de 30 °C. Luego se agregó la levadura, se mezcló y se adicionó glicerina, la cual se homogenizó totalmente hasta que la solución quedó uniforme.

Los pellets fueron formados mediante presión dejándose caer gota a gota en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 4% permaneciendo por un lapso de 12 horas, finalizado el tiempo fueron colocadas en una solución salina (0.9% NaCl) y se llevó a refrigeración durante 24 horas para su

conservación, en la **Fig. 24** se observa el proceso de formación de pellets.

Después de la refrigeración los pellets fueron separados a través de una gasa, lavándose con agua destilada y luego con Buffer Acetato pH 5.0 tres veces para remover el material soluble.



**Figura 24.** Elaboración de los pellets de pectina-gelatina por gelificación iónica

## 2.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS PELLETS

### 2.2.5.1. Diámetro de los pellets

Los pellets después de las 12 horas fueron filtrados de la solución de  $\text{CaCl}_2$  4% usando una gasa, luego se lavaron 2 veces con agua destilada y una vez con solución salina (85% m/v NaCl) antes de calcular su tamaño. El diámetro de los pellets fue determinado usando un Vernier de metal de 12 cm.

### 2.2.5.2. Determinación de la densidad celular

#### a. Disolución de pellets

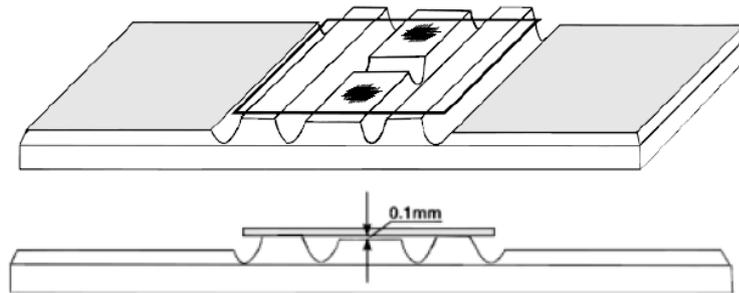
Se colocó 0.5 g de pellets en una placa Petri estéril, adicionándose 5 mL de Citrato de sodio (6% m/v), luego se colocó a temperatura ambiente durante unos 10 a 15 minutos para solubilizar la pectina y la gelatina.

A continuación, se colocó en un hot plate a 30 °C hasta obtener una solución homogénea, de la cual se tomó 1 mL y con ello se prepararon las disoluciones seriadas, en caso fuese necesario.

#### b. Conteo celular en cámara de Neubauer

Para el conteo celular primero se realizó el lavado de la cámara y cubreobjetos con agua destilada y posteriormente con alcohol 96%.

La cámara de recuento se fijó en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica. Se colocó la muestra en una de las ranuras de la cámara y, por capilaridad las levaduras se distribuyeron en la cámara de Neubauer; se esperó de 1 a 2 minutos antes de realizar el conteo para que las levaduras se depositen, como se observa en la **Fig. 25**.



**Figura 25. Cámara de Neubauer**

**Libkind<sup>48</sup>**

Se realizaron tres repeticiones y se empleó la siguiente fórmula para determinar la densidad celular de las levaduras, siendo la altura de la cámara de Neubauer igual a 0.1 mm<sup>3</sup>.

$$N^{\circ} \text{ levaduras } \left( \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ levaduras } 5 \text{ cuadrantes}}{\text{Área contada} * \text{Altura de la cámara}}$$

## 2.2.6. PROCESO DE FERMENTACIÓN USANDO PELLETS

### 2.2.6.1. Mosto de manzana

Se utilizaron manzanas de la variedad Delicia por ser muy aromática con muy poca acidez y por poseer una pulpa blanda. Se pesó 500 g para la elaboración del mosto.

Las manzanas fueron lavadas con agua corriente varias veces para evitar la presencia de impurezas, luego se cortaron en trozos pequeños para llevarlos a la licuadora, agregándose agua hervida tibia en una proporción 1:1 de manzana: agua.

Se procedió a filtrar el líquido (mosto) del bagazo de manzana, el mosto obtenido fue llevado a refrigeración hasta su utilización.

La medición de los °Brix se realizó empleando un refractómetro manual “Index”, luego se corrigieron los °Brix agregando azúcar, en una proporción de 10 g de azúcar para subir 1°Brix. El mosto fue pasteurizado durante 3 minutos a ebullición.

### 2.2.6.2. Fermentación del mosto de manzana

#### a. Equipo de fermentación

Se utilizaron recipientes de vidrio estériles de 250 mL; a cada recipiente se le colocó una manguera con una llave reguladora sobre su tapa, para poder controlar la eliminación de CO<sub>2</sub>.

#### b. Proceso

Se emplearon 3 recipientes de fermentación, a cada uno se adicionó 200 mL de mosto de manzana y 50 pellets, los cuales previamente fueron lavados con Buffer Acetato pH 5.

En el dispositivo de baño maría digital fueron colocados durante 14 días, a una temperatura de 28 °C a 30 °C, se efectuaron lecturas diarias de los °Brix con previa agitación; al tercer día finalizando la fermentación anaerobia, se realizó la liberación del CO<sub>2</sub> producido, mediante la llave reguladora.

Finalizado el proceso de fermentación se obtuvo la bebida fermentada (sidra), procediéndose a separar los pellets mediante filtración, se pasteurizó la sidra durante 5 minutos a 92 °C.

Los pellets separados mediante filtración fueron lavados con Buffer Acetato y agua destilada para reutilizarlos en las siguientes fermentaciones.

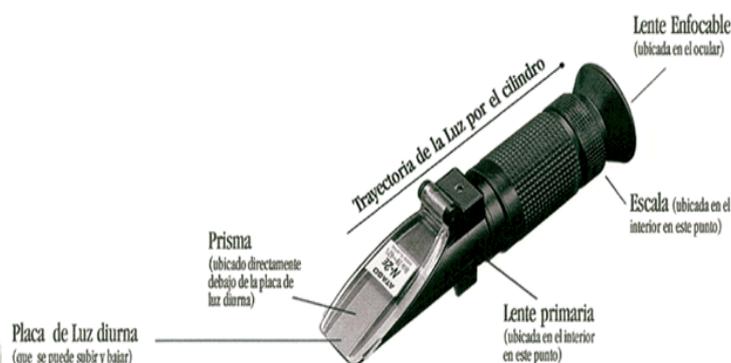
### 2.2.7. CARACTERIZACIÓN DE LA BEBIDA FERMENTADA

#### 2.2.7.1. Determinación de los grados Brix

Los grados Brix se midieron con un refractómetro (**Fig. 26**), usando una pipeta Pasteur se depositó una gota de la bebida fermentada sobre la superficie del prisma previamente limpia y seca.

La tapa se cerró con cuidado formando una fina capa que cubrió la superficie del prisma y se observó la escala a través del lente con la luz del sol de frente realizándose la lectura.

Las mediciones se efectuaron a cada lote diariamente durante el proceso de fermentación y asimismo al final del proceso.



**Figura 26. Partes del refractómetro**  
**Aprende a catar vino (2009)<sup>49</sup>**

### 2.2.7.2. Determinación del grado alcohólico

El método empleado para la determinación del grado alcohólico fue por picnometría<sup>50</sup>.

Primero se calibró el picnómetro limpio (fiola) de 100 mL a 20 °C, llenándolo con agua y sumergiéndolo en un baño de agua a la temperatura de referencia durante 15 minutos.

Se retiró el picnómetro y su contenido fue vaciado, luego se enjuagó con 5 mL de acetona y se secó completamente, después se colocó la tapa y se pesó ( $P_1$ ). Seguidamente se llevó a destilación aproximadamente 200 mL de la bebida fermentada, hasta obtener un volumen de destilado de 70 mL a 80 mL.

El volumen obtenido se colocó en el picnómetro, el cual fue aforado usando agua destilada y se procedió a pesarlo ( $P_2$ ) en una balanza analítica. Se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso de la muestra}(g) = P_2 - P_1$$

Con el valor resultante se aplicó la fórmula de la densidad para finalmente obtener el porcentaje de grado alcohólico empleando la Tabla de la Norma Técnica Peruana (**ANEXO N° 4**).

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. EXTRACCIÓN DE LA PECTINA

Se emplearon dos métodos de extracción: el convencional y del ácido cítrico, el cual tuvo diferentes parámetros de temperatura y tiempo, obteniéndose pectinas de diferentes colores y texturas.

La pectina extraída por el método convencional se obtuvo con una solución acidulada a un pH 1.5 (ácido sulfúrico) a 90 °C por 60 minutos, con el fin de compararlo con el método del ácido cítrico; obteniéndose una pectina de una tonalidad rojiza con una textura rígida y con un ligero olor al ácido empleado, la cual no llegaba a disolver siendo un factor determinante para su elección.

Las pectinas obtenidas por el método del ácido cítrico empleando una concentración de 0.3% a un pH 3; se emplearon diferentes temperaturas 90 °C y 75 °C así como a distintos tiempos 75 y 100 minutos.

Las pectinas obtenidas a 90 °C con dos diferentes tiempos: a 100 minutos, presentó un color marrón con una textura ligeramente rugosa, la cual necesitaba calor para su total disolución y, a 75 minutos se observó que la pectina presentó un color café con una textura lisa y disolución completa.

Las pectinas obtenidas a 75 °C con dos diferentes tiempos: a 100 minutos, se obtuvo una pectina con una tonalidad café claro, una textura suave, disolvía completamente y, a 75 minutos se obtuvo una pectina de un color café más claro con iguales propiedades a la obtenida a 100 minutos, en la **Tabla 9** se muestran las propiedades de las diferentes pectinas.

**Tabla 9. Propiedades cualitativas de la pectina a diferentes parámetros**

MÉTODO	PARÁMETROS			COLOR	TEXTURA
	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)		
Convencional	1.5	90	60	Rojiza	Rígida
Ácido Cítrico	3.0	90	100	Marrón	Rugosa
			75	Café	Lisa
		75	100	Café claro	Suave
			75	Café más claro	Suave

En estudios recientes (Suárez<sup>2</sup>, Vriesmann<sup>51</sup>, Munhoz<sup>52</sup>) demostraron que emplear ácidos orgánicos como el ácido cítrico para la extracción de pectina es efectivo en términos de rendimiento y en las propiedades fisicoquímicas de la misma; además el ácido cítrico es natural, seguro para la alimentación y resulta más conveniente que los ácidos minerales (ácido nítrico, clorhídrico y sulfúrico). Siendo favorable desde el punto de vista económico y ambiental ya que reduce el impacto de los efluentes corrosivos generados por el uso de ácidos convencionales para la extracción de la pectina.

Luego del proceso de hidrólisis, se separó las sustancias pécticas mediante centrifugación y se agregó alcohol etílico absoluto, obteniéndose así el precipitado de color crema y textura gelatinosa similar al descrito por Barazarte<sup>3</sup>, el cual se tornó de color café al poco tiempo de extraído, probablemente por la presencia de fenoles;

asimismo el color oscuro en las pectinas extraídas puede ser causada por la presencia de taninos.

Las condiciones de extracción (pH, temperatura y tiempo) tienen una gran influencia sobre la pectina, tanto en los aspectos cualitativos como cuantitativos, resultando en alteraciones en el rendimiento, en la capacidad gelificante y en el grado de esterificación<sup>19</sup>.

La pectina es un ácido con valor de pKa de aproximadamente 3.5 aumentando la relación entre los grupos ácidos disociados y grupos ácidos no disociados<sup>53</sup> por ello se empleó pH 3, ya que pH entre 1.5 a 2.4 puede causar su despolimerización<sup>3</sup>, mientras que a pH entre 4 a 6 la velocidad de desesterificación es superior que la despolimerización acelerando su desintegración<sup>54</sup>. En medio ácido ocurre la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y la desmetoxilación de los grupos esterificados de la pectina, mientras que en condiciones drásticas se puede llegar a afectar las características generales de la pectina<sup>22</sup>.

En medio básico o alcalino ocurre una desmetoxilación rápida, así como una degradación que se inicia por la ruptura de los enlaces glucosídicos en  $\beta$  (C<sub>4</sub>), al grupo carboxílico del éster (receptor de electrones), por un mecanismo de  $\beta$ -eliminación<sup>22</sup>.

### 3.2. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN

Los factores de la temperatura y tiempo fueron parámetros importantes para poder evaluar el rendimiento de la pectina obtenida de la cascarilla de cacao.

**Tabla 10. Rendimiento de la pectina**

Método	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Rendimiento (%)
Convencional	1.5	90	60	4.55
Ácido Cítrico	3.0	90	75	4.65
			100	4.87
		75	75	2.31
			100	4.61

En la **Tabla 10** el rendimiento mostrado fue a partir de cascarilla desengrasada, observándose que a una temperatura de 90 °C durante 100 minutos se consiguió un rendimiento de 4.87% mientras que un rendimiento de 2.31% se alcanzó a 75 °C durante 75 minutos.

A 75 °C por 75 minutos se obtuvo un rendimiento de 1.68% iniciando de cascarilla bruta, originándose una pérdida durante el proceso de desengrase.

Vriesmann<sup>51</sup> menciona que el tiempo y la temperatura empleada aumenta significativamente el rendimiento de la pectina. La pectina extraída a la temperatura de 90 °C presenta un mayor rendimiento debido a la ruptura de los enlaces presentes en la protopectina originado por el incremento de la temperatura.

Según Chan<sup>54</sup> en el proceso de hidrólisis se solubiliza la pectina y otros componentes pécticos mantenidos en la pared celular, denominada protopectina la cual representa un grupo de sustancias insolubles en agua presentes en las paredes celulares vegetales, por lo tanto, aumenta el rendimiento de la misma.

El rendimiento obtenido en este estudio fue menor comparado con otras investigaciones, tales como en cáscaras de cítricos 12g/100g por Devia<sup>55</sup> en pulpa de manzana 25g/100g por Untiveros<sup>56</sup> y en guayaba deshidratada 7.83-13.66g/100g por Munhoz<sup>52</sup>.

En investigaciones realizadas usando cacao, Adomako<sup>57</sup> reportó de 8.0 a 11.0g/100g de pectinas obtenidas a partir de cáscaras de cacao, mientras que Barazarte<sup>3</sup> consiguió un rendimiento de 3.89g/100g de pectinas obtenidas a partir de cáscaras de cacao tipo Forastero y Suárez<sup>2</sup> reportó de 11g a 26.76g/100g a partir de cascarilla de cacao.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA PECTINA

#### 3.3.1. DETERMINACIÓN DEL PESO EQUIVALENTE

El peso equivalente obtenido fue 452.03 mg/meq. Suárez<sup>2</sup> menciona que, la estructura péctica está constituida principalmente por monómeros de ácido D-galacturónico, molécula que presenta el grupo funcional carboxilo (COOH) por lo tanto, el peso equivalente representa el número de grupos carboxílicos libres que no se encuentran esterificados; en la pectina extraída se tiene un bajo peso

equivalente que se interpreta como un alto contenido de grupos carboxílicos metoxilados y por lo tanto un alto contenido de AAG.

### 3.3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METOXILO

El porcentaje de metoxilación obtenido fue 7.21%, comparando el grado de esterificación con el contenido de metoxilo se reafirma que existen otros grupos químicos que intervienen en la esterificación con los grupos carboxilos del ácido anhidrogalacturónico, se ratifica que es una pectina de baja metoxilación.

### 3.3.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ANHIDROGALACTURÓNICO

El porcentaje obtenido de ácido anhidrogalacturónico (AAG) fue 79.90% el cual está relacionado con el peso equivalente calculado anteriormente, en la pectina extraída se tiene un bajo peso equivalente que se interpreta como un alto contenido de grupos carboxílicos metoxilados y por lo tanto un alto contenido de AAG.

Los contenidos más altos de AAG observados a 75 °C, se debe a que se alcanza una mayor ruptura de los enlaces presentes en la estructura de la protopectina, debido a que la temperatura es un factor con mayor incidencia en la pureza de la pectina.

Guerrero<sup>58</sup> menciona que, el ácido anhidrogalacturónico es un referente que permite ver el grado de pureza de la sustancia péctica, debido a que este polisacárido debe encontrarse constituido en su mayoría por ácido galacturónico en presencia de otros azúcares.

El valor promedio obtenido es superior al valor mínimo establecido por la FAO que especifica que la cantidad mínima de ácido anhidrogalacturónico es 65g/100g; los valores de AAG obtenidos en las pectinas procedentes de otras fuentes fueron de 87.93g/100g en pulpa de níspero por Chasquibol<sup>20</sup>, 68.84g/100g en pulpa de guayaba deshidratada por Munhoz<sup>52</sup> y 60.15 a 78.00g/100g en cáscara de parchita por D'Addosio<sup>59</sup>.

En investigaciones realizadas usando cacao, Barazarte<sup>3</sup> reportó valores de AGA entre 49.81 y 64.06 g/100g en pectinas de cáscaras de cacao tipo Forastero, Adomako<sup>57</sup> reportó valores entre 33.2 y 36.2g/100g en cáscaras de cacao y Suárez<sup>2</sup> reportó valores entre 21.16 a 24.8g/100g en cascarilla de cacao.

### 3.3.4. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ESTERIFICACIÓN

El contenido de metoxilo y el grado de esterificación están relacionados, obteniéndose 51.22% de grado de esterificación lo cual la caracterizaría como pectina de alta metoxilación por ser mayor a 50%; en este caso no gelificaba a altas temperaturas ni al adicionarle sacarosa, contrario a lo que sucedió en presencia de iones calcio, con los cuales se dio la formación de la estructura básica del gel. Se obtuvo un porcentaje mayor a lo esperado, debido a que podrían existir grupos carboxilo esterificados con otros grupos como etoxilo o amidas mencionado por Suárez<sup>2</sup>.

Mendoza<sup>60</sup> menciona que, la pectina en estado inmaduro está totalmente esterificada, lo que le confiere mayor rigidez al tejido y, durante la maduración los tejidos de los frutos presentan una variación del contenido de pectina soluble convirtiendo la protopectina en pectina soluble, ablandando los frutos y disminuyendo el grado de metoxilación. Lo cual indica que, el grado de maduración de los frutos es un factor determinante en la extracción de pectinas.

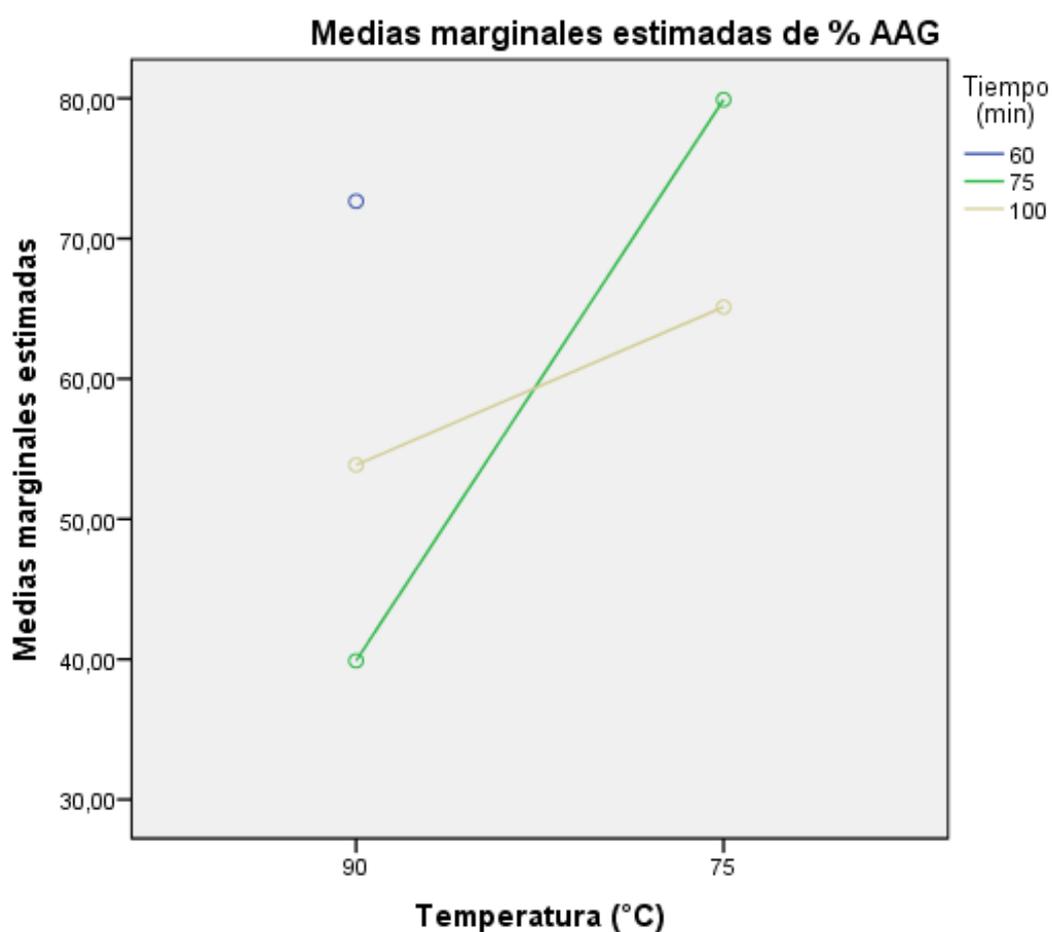
En investigaciones realizadas Barazarte<sup>3</sup> reportó 37.5 a 49.8% en el grado de esterificación en cáscara de cacao tipo Forastero; mientras que Adomako<sup>57</sup> reportó grado de esterificación 60 a 76.3% en cáscaras de cacao asimismo Suárez<sup>2</sup> reportó grado de esterificación 65.6 a 72.5% en cascarilla de cacao.

En la **Tabla 11**, se muestran los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de la pectina, usando diferentes parámetros de extracción con variables de tiempo y temperatura.

Tabla 11. Características fisicoquímicas de la pectina extraída

pH	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de Ensayos	Metoxilos (%)	AAG (%)	Peso Equivalente (mg pectina/meq NaOH)	Grado Esterificación (%)
1.5	90	60	1	2.98	72.16	318.47	23.41
			2	2.79	73.92	303.03	21.43
			3	3.10	73.92	312.50	23.81
			<b>PROMEDIO</b>	<b>2.96</b>	<b>73.33</b>	<b>311.33</b>	<b>22.88</b>
			<b>Desv. Estándar</b>	0.16	1.02	7.79	1.28
3.0	90	75	1	1.86	35.20	714.29	30.00
			2	3.22	42.24	735.29	43.33
			3	3.10	42.24	714.29	41.67
			<b>PROMEDIO</b>	<b>2.73</b>	<b>39.89</b>	<b>721.29</b>	<b>38.33</b>
			<b>Desv. Estándar</b>	0.75	4.06	12.13	7.26
		100	1	1.61	54.91	384.62	16.67
			2	2.17	56.32	400.00	21.88
			3	3.10	50.34	537.63	34.97
			<b>PROMEDIO</b>	<b>2.29</b>	<b>53.86</b>	<b>440.75</b>	<b>24.50</b>
			<b>Desv. Estándar</b>	0.75	3.13	84.26	9.43
	75	75	1	7.13	78.50	462.96	51.57
			2	6.82	78.85	438.60	49.11
			3	7.69	82.37	454.55	52.99
			<b>PROMEDIO</b>	<b>7.21</b>	<b>79.90</b>	<b>452.03</b>	<b>51.22</b>
			<b>Desv. Estándar</b>	0.44	2.14	12.38	1.97
		100	1	1.24	67.23	292.40	10.47
			2	2.11	71.10	297.62	16.83
3			3.10	57.02	446.43	30.86	
<b>PROMEDIO</b>			<b>2.15</b>	<b>65.12</b>	<b>345.48</b>	<b>19.39</b>	
<b>Desv. Estándar</b>	0.93	7.27	87.46	10.43			

Al realizar ANOVA de dos factores a los datos obtenidos en las características fisicoquímicas, se halló que la significancia es de 0.000125, al ser menor a 0.05 se afirma que, existe una interacción entre temperatura y tiempo con el contenido de Ácido anhidrogalacturónico; demostrando que si existe diferencia significativa. Se aplicó el programa estadístico SPSS Statistics 22, en el **APÉNDICE B** se observan las tablas y gráficas.



Las medias no estimables no se trazan.

**Figura 27. Medias de los porcentajes de Ácido anhidrogalacturónico relacionadas con la temperatura y tiempo**

En la **Fig. 27** se muestra que a 90 °C por 75 minutos se obtuvo la menor cantidad de Ácido anhidrogalacturónico y el mayor porcentaje de Ácido anhidrogalacturónico fue obtenido a 75 °C durante 75 minutos, siendo la

pectina seleccionada; la cual presentó características organolépticas como: color café más claro, una textura suave, olor ligeramente dulce y un sabor neutro; fue secada durante dos días al medio ambiente, la pectina se observa en la **Fig. 28**.



**Figura 28. Pectina en polvo seleccionada**

### **3.4. COMPOSICIÓN DE LA PECTINA**

#### **3.4.1. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES**

##### **3.4.1.1. Preparación de la curva de calibración de glucosa**

Para realizar el cálculo de la concentración de carbohidratos totales es necesario, previamente conseguir la recta de calibrado; a partir de una solución Stock de glucosa 1000 ppm.

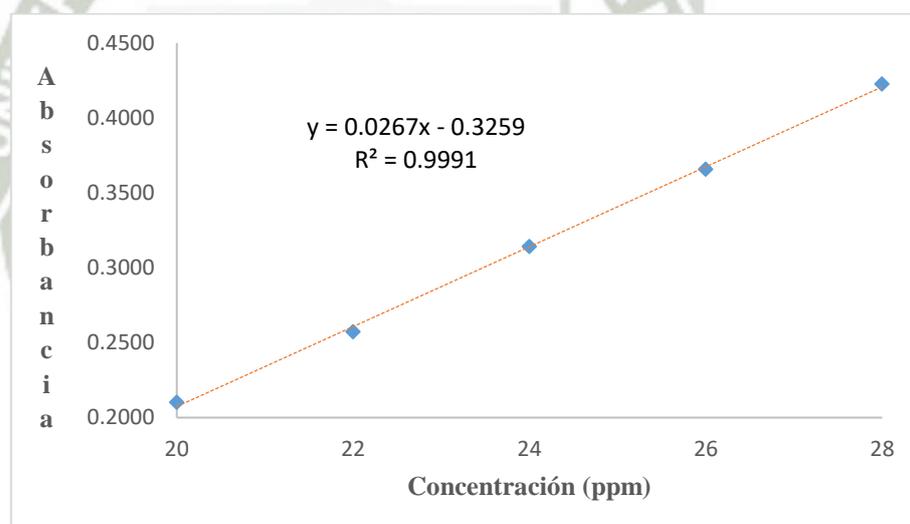
Los carbohidratos se determinaron empleando el método de Dubois modificado por Rao para elaborar la recta de calibrado, utilizándose una longitud de onda de 492 nm, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de azúcares presentes.

En la **Tabla 12** se muestran las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones de ácido gálico (mg/L), el ensayo se realizó tres veces para probar la linealidad de las curvas estándar, sus gráficas se observan en el **APÉNDICE C**.

**Tabla 12. Patrones para la curva de calibración de Dubois**

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Absorbancia Promedio	Desviación Estándar
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
20	0.2208	0.1960	0.2140	0.2103	0.013
22	0.2680	0.2440	0.2600	0.2573	0.012
24	0.3205	0.3080	0.3140	0.3142	0.006
26	0.3595	0.3760	0.3620	0.3658	0.009
28	0.4380	0.4290	0.4010	0.4227	0.019

Es importante establecer que la absorbancia depende de la concentración de la solución; este concepto se resume matemáticamente en la Ley Beer-Lambert que relaciona la absorbancia con las propiedades de la solución y la geometría de muestreo.

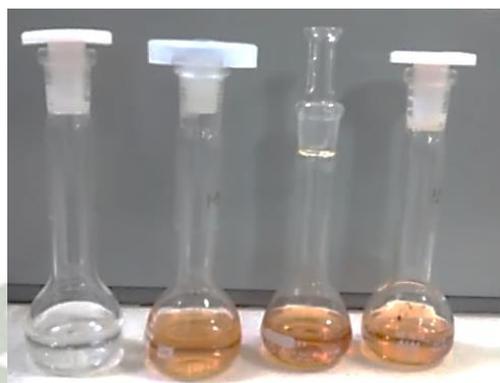


**Figura 29. Curva de calibración de glucosa**

El **Fig. 29** muestra la linealidad de las curvas estándar en ella se observa la ecuación de la recta:  $y = 0.0267x - 0.3259$ . Asimismo, se observa el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) resultando 99.91 %, esto sugiere un buen ajuste de los datos de la línea recta muy cercano a la unidad.

### 3.4.1.2. Contenido de carbohidratos totales en la muestra de pectina

Las muestras de pectina al reaccionar con el ácido sulfúrico sufrieron una deshidratación de los azúcares originando furfural que al reaccionar con el fenol se condensan presentando una coloración anaranjada intensa, como se observa en la **Fig. 30**.



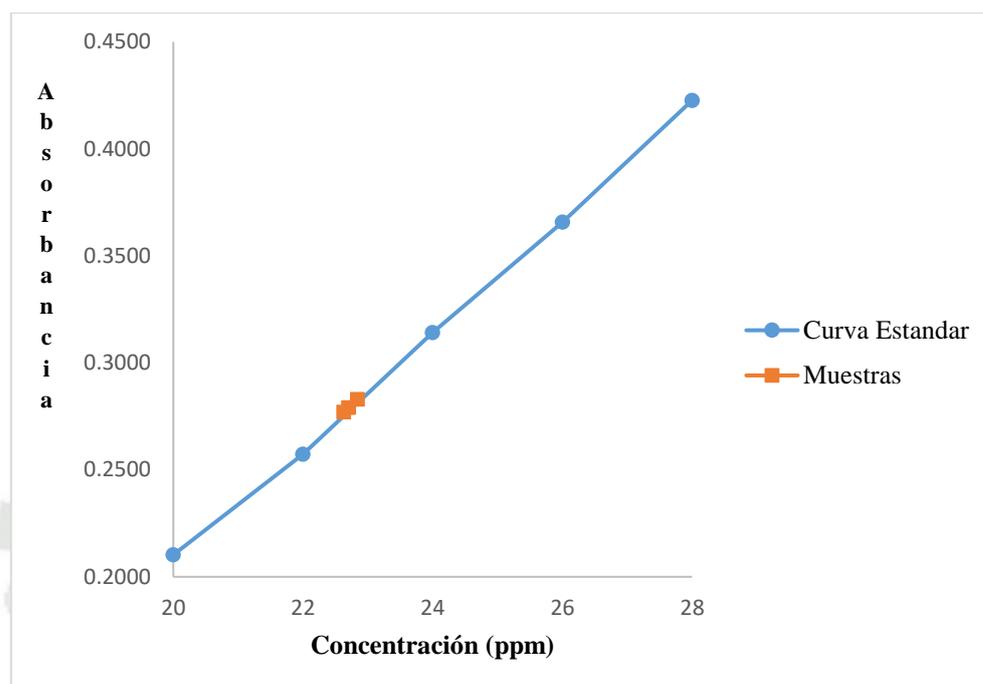
**Figura 30. Muestras de pectina para Dubois**

Las muestras fueron llevadas al espectrofotómetro, siendo leídas a una longitud de onda de 492 nm, mostrándose en la **Tabla 13** los resultados obtenidos de los compuestos coloreados cuantificados por el método colorimétrico, el cual dio un promedio de 47.91g/100g de azúcares totales encontrados en la pectina.

**Tabla 13. Contenido de carbohidratos totales en pectina**

Repeticiones	Absorbancia	g / 100 g
1	0.283	48.477
2	0.277	47.449
3	0.279	47.791
	<b>Promedio</b>	47.906
	<b>Desviación Estándar</b>	0.523

En el **Fig. 31** se observan los valores encontrados en la muestra relacionados con la curva de calibración de glucosa, realizándose tres lecturas de la pectina obtenida.



**Figura 31. Muestras de pectina en la curva de calibración de glucosa**

Nielsen<sup>61</sup> indica que, el ácido sulfúrico concentrado descompone cualquier polisacárido, oligosacárido y disacárido en monosacáridos; las pentosas (compuestos de 5 carbonos) se deshidratan a furfural y hexosas (compuestos de 6 carbonos) a hidroximetil furfural. Estos compuestos luego reaccionan con el fenol para producir un color amarillo dorado, para los productos con alto contenido de azúcares hexosas; la glucosa se usa comúnmente para crear la curva estándar.

Romero<sup>62</sup> menciona los principales azúcares presentes en la pulpa de cacao como fructosa (0.35% a 1.19%), glucosa (0.11% a 0.84%) y sacarosa (0.11% a 1.32%) representan entre 2% y 9 % de la materia seca. El contenido de azúcares varía según la influencia del clima, en épocas lluviosas aumenta el contenido siendo este no muy significativo.

En otras investigaciones realizadas Suárez<sup>2</sup> obtuvo 42.03% de carbohidratos totales empleando cáscara de cacao, en el caso de Vriesmann<sup>51</sup> consiguió 64% de carbohidratos totales, asimismo Romero<sup>62</sup> reportó 2.84%, 2.70% y 1.51% de azúcares totales en la

pulpa de cacao maduros de las variedades: Criollo, Híbrido y Forastero respectivamente.

### 3.4.2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

#### 3.4.2.1. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico

Para realizar el cálculo de la concentración de fenoles totales es necesario previamente obtener la recta de calibrado; para ello primero se efectuó la curva de calibración usando una solución Stock de ácido gálico 100 ppm.

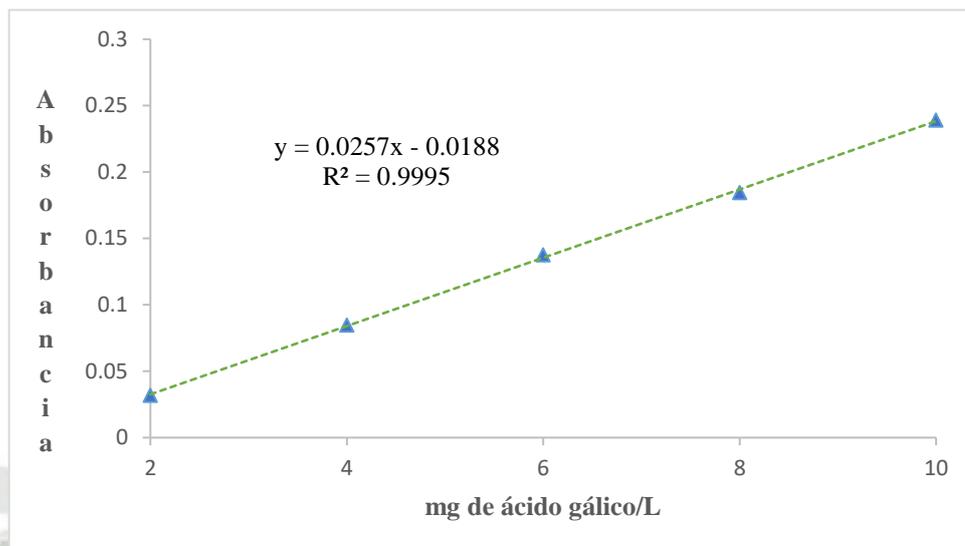
Los fenoles se determinaron de acuerdo al método de Folin Ciocalteu, elaborándose la recta de calibrado, para ello se empleó una longitud de onda de 760 nm, siendo la intensidad del color directamente proporcional a la concentración de fenoles presentes.

En la **Tabla 14** se muestran las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones de ácido gálico (mg/L) realizado por triplicado, sus gráficas se observan en el **APÉNDICE D**.

**Tabla 14. Patrones para la curva de calibración de Folin**

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Absorbancia Promedio	Desviación Estándar
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
2	0.025	0.036	0.034	0.032	0.006
4	0.077	0.086	0.091	0.085	0.007
6	0.130	0.146	0.137	0.138	0.008
8	0.178	0.192	0.183	0.184	0.007
10	0.237	0.251	0.229	0.239	0.011

En el **Fig. 32** se muestra la recta promedio de regresión lineal obtenida de las diferentes concentraciones de ácido gálico en mg/L y el valor promedio de las absorbancias medidas, se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual a 99.95%.



**Figura 32. Curva de calibración de ácido gálico**

Se puede observar que la ecuación obtenida es de orden lineal, ya que el coeficiente de determinación es cercano a la unidad, mostrándose que existe una relación directa entre la concentración de los compuestos fenólicos y su absorbancia.

#### 3.4.2.2. Contenido de fenoles totales en la muestra de pectina

Los fenoles presentes en la pectina al reaccionar con el reactivo de Folin forman complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico que al interactuar con el carbonato de sodio se reducen estos complejos a óxidos cromógenos de color azul (Fig. 33).



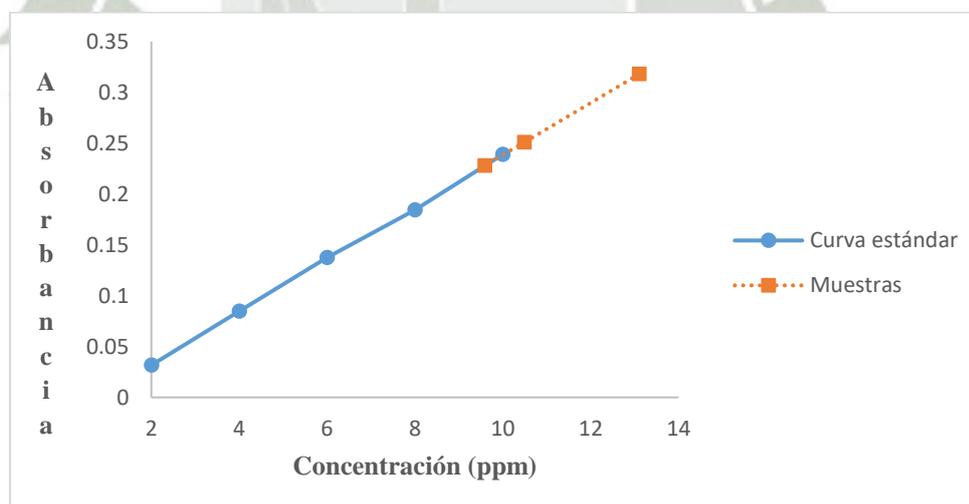
**Figura 33. Muestras de pectina para Folin**

Las muestras fueron llevadas al espectrofotómetro, siendo leídas a una longitud de onda de 760 nm, el promedio de los polifenoles totales encontrados en la pectina fue de 3.73g/100g, en la **Tabla 15** se muestran los resultados obtenidos tanto su absorbancia como la concentración de la muestra de pectina por triplicado.

**Tabla 15. Contenido de fenoles totales en pectina**

Repeticiones	Absorbancia	g/100 g
1	0.318	4.462
2	0.251	3.522
3	0.228	3.199
<b>Promedio</b>		3.728
<b>Desviación Estándar</b>		0.656

En el **Fig. 34** se observan los valores encontrados en la muestra en relación a la curva de calibración de ácido gálico, realizándose tres lecturas de la pectina obtenida.



**Figura 34. Muestra de pectina en la curva de calibración de ácido gálico**

Suárez<sup>2</sup> menciona que, la presencia de compuestos fenólicos en la cascarilla y grano seco de cacao está entre 10-20%, los principales compuestos polifenólicos que presenta son las catequinas 3-6%,

leucocianidinas 2-5% y taninos de 2-3.5%, estos otorgan coloración oscura y sabor astringente-amargo.

Oliveira<sup>63</sup> indica que, en la semilla de cacao se encuentran grandes cantidades de flavonoides, el contenido de polifenoles en la semilla puede variar dependiendo de la región donde es cultivado, así como de la variedad. Además, demostró que, los polifenoles son arrastrados en el proceso de desengrase junto a la grasa y se degradan debido a la temperatura utilizada.

El resultado obtenido para las muestras de pectina fue 3.73g/100g debido a que, se realizó un pre-tratamiento de la cascarilla de cacao usando alcohol etílico absoluto antes de realizar el proceso de extracción y también se realizó un proceso de desengrase, lo que redujo la cantidad de fenoles totales presentes.

En investigaciones realizadas Vriesmann<sup>51</sup> reportó un contenido de 9.4g/100g en cáscara de cacao, Suárez<sup>2</sup> reportó un contenido de 9.68g/100g en cascarilla de cacao y Oliveira<sup>63</sup> reportó un resultado de 2.40 a 7.21g/100g en semillas de cacao.

### **3.5. EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae***

#### **3.5.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTIMOS**

En un primer experimento se varió la concentración de pectina para la inmovilización de la levadura y la formación de esferas, que es un sistema en donde la levadura se encuentra homogéneamente dispersa en una matriz polimérica donde no se observa un núcleo diferenciado, a las cuales se les ha denominado pellets.

En las pruebas realizadas se observó que el gel formado sólo por la pectina no tuvo la estabilidad y rigidez necesaria para la inmovilización, por ello se realizaron diversas combinaciones con otros polímeros: goma arábiga, agar-agar, gelatina; en el caso de la goma arábiga y agar-agar no fueron elegidos porque el mecanismo de formación del gel se da por precipitación, mientras que la pectina es por red iónica.

La selección de la gelatina como soporte para la inmovilización de levaduras es justificada por su afinidad a los polisacáridos, biocompatibilidad; contiene grupos carboxilo en sus cadenas principales teniendo la capacidad de formar puentes de hidrógeno con la pectina dando lugar a una estructura denominada red o matriz polimérica<sup>64</sup>.

En la **Tabla 16**, se detallan los ensayos realizados con pectina y gelatina para la formación de la red polimérica en la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla 16. Evaluación de la formación de los pellets pectina-gelatina**

N° de Ensayos	Pectina (%)	Gelatina (%)	Conformación de los pellets
1	100	0	-
2	95	5	-
3	85	15	++
4	75	25	+++
5	65	35	++
6	50	50	+

Donde:

- No tiene estabilidad.
- + Presenta estabilidad.
- ++ Presenta estabilidad y consistencia.
- +++ Presenta estabilidad, consistencia y durabilidad.

Por la evaluación realizada la mejor combinación fue con 75% de pectina y 25% de gelatina, la cual presentó mejor estabilidad, consistencia y durabilidad en el medio, lo cual no paso con cantidades inferiores y superiores a 75% de pectina, el pellet no tuvo una buena consistencia macroscópica.

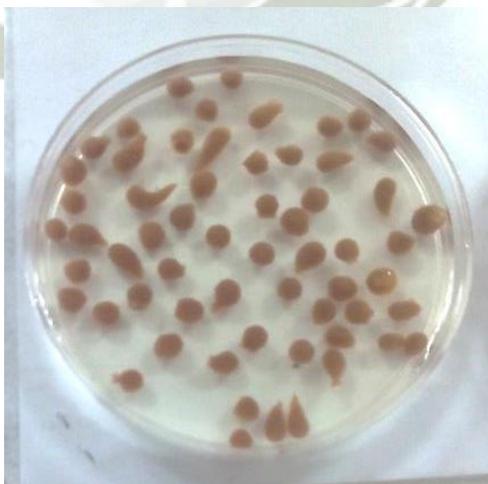
Bonini<sup>39</sup> mencionó que, en proporciones adecuadas las proteínas y los polisacáridos forman complejos con propiedades funcionales superiores en

comparación a utilizarlos de forma separada; existiendo una atracción entre los biopolímeros debido a la relación en sus interacciones electrostáticas, cuando los dos polímeros presentan grupos funcionales cargados con cargas opuestas.

La solidez del pellet está relacionada con la interacción del cloruro de calcio, por ello se utilizaron diferentes concentraciones las que fueron: 2%, 3%, 4%, 5% y 8% m/v. Se consiguió apreciar que, los pellets obtenidos en una concentración de 2% y 3%  $\text{CaCl}_2$  presentaban poca firmeza, en comparación con concentraciones superiores 5%, 8%  $\text{CaCl}_2$  mostraban una estructura más rígida.

En base a los resultados obtenidos se estableció que la mejor concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue de 4% contribuyendo a una mejor reticulación, por lo que se empleó esta concentración para los siguientes ensayos.

A la matriz polimérica conformada por la mezcla de pectina – gelatina elegida se le agregó 7 mL de Buffer Fosfato pH 8, también se añadió 1 mL de levadura activada, después se adicionó 0.2 mL de glicerol, esta mezcla fue homogenizada y con la ayuda de una jeringa se dejó caer gota a gota en la solución de cloruro de calcio 4% previamente preparada y dejadas por un periodo de 12 horas para que los iones calcio conformen los pellets. Después de este tiempo fueron separados de la solución de  $\text{CaCl}_2$  por filtración simple, en la **Fig. 35** se observan los pellets obtenidos.



**Figura 35. Pellets de pectina - gelatina en suero fisiológico**

Los pellets formados estuvieron en contacto en una solución de suero fisiológico o solución salina durante 24 horas en refrigeración, esta misma solución se empleó para su almacenamiento prolongado.

El glicerol empleado en la formación de pellets pectina - gelatina cumple la función de plastificante mientras que el buffer mantiene el pH necesario para las levaduras encapsuladas las cuales son sensibles a los cambios de pH.

Nawawi citado por Dos Santos<sup>65</sup> sostiene que la estabilidad y rigidez del gel está directamente relacionada con la concentración de la pectina y del  $\text{CaCl}_2$ , mencionando la probabilidad que existan grupos carboxílicos libres en la pectina los cuales se unen a los iones calcio, agrupando así las cadenas poliméricas para formar un gel rígido.

Juárez citado por Dos Santos<sup>65</sup> menciona que la estabilidad y consistencia del gel es un factor importante, debido a que el proceso de difusión en un gel muy rígido no se podría llevar a cabo, ya que aumentaría la barrera difusional y afectaría el rendimiento de las reacciones.

Los pellets obtenidos presentaron una buena consistencia, estabilidad permitiendo que las levaduras inmovilizadas puedan realizar el proceso fermentativo, debido a la adecuada concentración de  $\text{CaCl}_2$  empleada en su formación.

### 3.5.2. EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS PELLETS

Los pellets preparados por el método de gelificación iónica que fue mencionado anteriormente, presentaron forma ovoide regular y un bajo grado de aglomeración, algunos de los cuales presentaron pequeñas extensiones, la superficie de los mismos mostraron un aspecto poroso, de textura suave al tacto, con un color café claro.

En la **Fig. 36** se muestran los pellets elaborados a los cuales se midió el diámetro empleando para ello un Vernier.



**Figura 36. Pellets de pectina - gelatina medidos con Vernier**

Alves<sup>66</sup> menciona que, la presencia de un exceso de calcio, forman varias unidades primarias aglomeradas en capas y ese exceso de cationes componen agregados secundarios los que permanecen débilmente unidos y esto contribuye a la formación insuficiente de los pellets.

Por ello la concentración de  $\text{CaCl}_2$  al 4%, fue una condición óptima para la formación de los pellets de pectina – gelatina en el proceso de inmovilización, obteniéndose una producción homogénea presentando un tamaño promedio de 0.40 cm, en la **Tabla 17** se muestra el diámetro medido a 10 diferentes pellets, los cuales muestran una distribución similar.

**Tabla 17. Diámetro de los pellets de pectina - gelatina**

Repeticiones	Medidas (cm)
1	0.34
2	0.30
3	0.46
4	0.35
5	0.39
6	0.37
7	0.39
8	0.44
9	0.50
10	0.42
<b>Promedio</b>	0.40
<b>Desviación Estándar</b>	0.06

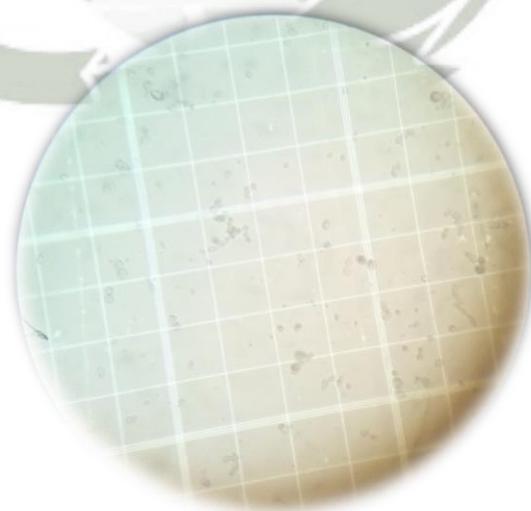
Castillo<sup>67</sup> menciona que, la porosidad sugiere la posibilidad de facilitar la entrada y salida de los solventes, a fin de hacer más fácil la accesibilidad al entorno, aspectos como la distancia de separación de la boquilla, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación influyen en su forma esférica y tamaño.

Asimismo, otros factores determinantes que influyen en la forma de los pellets son: la concentración de pectina, la carga bacteriana y el tiempo de exposición al cloruro de calcio.

### 3.5.3. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR

Se realizaron conteos de levaduras en los pellets (0.5 g de pellets disueltos en 5 mL de citrato de sodio 6%) determinándose el número total mediante el conteo en Cámara de Neubauer, en tres repeticiones.

El conteo inicial efectuado a los pellets refrigerados en la solución salina, dio un resultado de 1 200 UFC/mL y el conteo final realizado después de reutilizar los pellets en las tres fermentaciones dio un valor de 60 300 UFC/mL, los cálculos realizados se observan en el **APÉNDICE E**. Esto confirma el incremento de la población de levaduras, demostrándose que en la fermentación se usaron los azúcares presentes para producir etanol y dióxido de carbono.



**Figura 37. Conteo en cámara de Neubauer**

En la **Fig. 37** se observó mediante el microscopio la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales están en la etapa de reproducción mediante gemación. Se realizó una dilución 1/10 observándose las células con facilidad para el conteo final, obteniéndose un resultado confiable.

Unam citado por Alvarado<sup>68</sup> indica que en la técnica de conteo de células uno de los factores que afecta la observación de las levaduras es la correcta dilución de la muestra empleada.

Stormo y Bashan citados por Hernández<sup>69</sup> mencionan que la inmovilización de las levaduras en los pellets tiene la ventaja de poder manejar la densidad celular ya que pueden sobrevivir largos periodos de tiempo conservando su actividad fisiológica, además brinda protección a los microorganismos contra el estrés ambiental.

Alcazar citado por De Andrade<sup>70</sup> realizó estudios de la actividad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* encapsulada en alginato de calcio, dando a conocer que las células inmovilizadas presentaron una menor sensibilidad tanto al estrés salino como al estrés alcohólico durante la fermentación, ya que la matriz de alginato en el sistema de fermentación contribuyó en la tolerancia al etanol.

### **3.6. EVALUACIÓN DE LA BEBIDA FERMENTADA**

#### **3.6.1. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS BRUX**

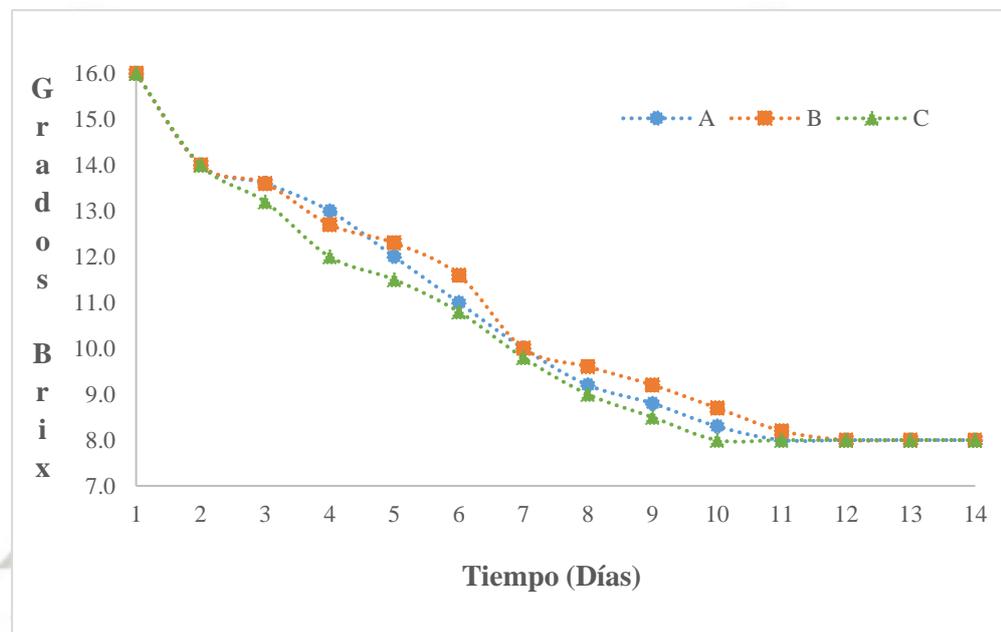
La etapa de fermentación se realizó empleando los pellets de pectina-gelatina en el mosto, siendo colocados en frascos de fermentación dentro del equipo de baño maría. Se evaluó el contenido de los azúcares presentes en el mosto de manzana, a través de la medición de los grados Brix utilizándose para ello el refractómetro.

Según Pereda<sup>71</sup> el grado Brix (°Bx) es una unidad de medida que toma como referencia el comportamiento de una disolución de sacarosa en agua pura, su medición corresponde al contenido de azúcares totales presentes.

El mosto de manzana inicialmente presentó 8 grados Brix y un pH igual a 4, se le adicionó azúcar hasta llegar a un rango de 16 a 20 grados Brix,

encontrándose en lo establecido por el Real Decreto para iniciar la fermentación.

En la **Fig. 38**, se observan tres diferentes lotes de mosto de manzana evaluados durante un periodo de 14 días a través de la medición de los °Bx, iniciando con 16 °Bx los cuales fueron disminuyendo con el transcurso de los días, se observa que se mantiene estable el nivel de azúcares durante los últimos días.



**Figura 38. Fermentación del mosto de manzana**

Según el Real Decreto<sup>72</sup> 72/2017 define el mosto de manzana como el producto obtenido de la molienda, maceración o prensado de las manzanas, mientras no haya iniciado la fermentación y con un grado Brix igual o superior a 10.2.

Durante el periodo de fermentación el cual fue de 14 días, se controló la temperatura en un rango de 25-28 °C, finalizado el proceso se obtuvo la bebida fermentada (sidra).

### 3.6.2. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS ALCOHÓLICOS

Al finalizar la fermentación se separaron los pellets de pectina-gelatina de la bebida alcohólica para su posterior reúso, en la **Fig. 39** se observa el producto final obtenido (sidra) la cual fue pasteurizada.



**Figura 39. Bebida fermentada obtenida**

Según Mariorella citado por De Andrade<sup>70</sup> la tasa de conversión teórica de la glucosa en etanol se define que, por cada gramo de glucosa se produce 0.511 g de etanol siendo un rendimiento teórico, no obstante Lima y Marcondes citado por De Andrade<sup>70</sup> relatan que durante la síntesis ocurren reacciones secundarias resultando en la reducción de rendimiento teórico conocido como rendimiento Pasteur, que demuestra que en el proceso el máximo rendimiento real es de 95%.

Según el Real Decreto<sup>72</sup> 72/2017 establece las normas básicas de calidad para la elaboración de las diferentes categorías de la sidra, estableciendo que la sidra natural tiene un grado alcohólico volumétrico igual o superior al 5% vol.

Se realizó la medición de los grados alcohólicos en base al método de picnometría mencionado anteriormente, el cual dio un resultado 6.1% el cual se encuentra de acuerdo con el Real Decreto, en la **Tabla 18** se observan las características organolépticas y fisicoquímicas de la sidra obtenida.

**Tabla 18. Características organolépticas y fisicoquímicas de la sidra**

<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Aspecto	Brillante y claro
Color	Amarillo
Olor	Ligeramente a manzana
Sabor	Dulce
<b>CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS</b>	<b>RESULTADOS</b>
Grado Alcohólico	6.1
Grados Brix	9
pH	3

Pantoja<sup>73</sup> menciona que la levadura inmovilizada tiene mejor adaptabilidad porque convierte más rápidamente el mosto en producto, por lo mismo facilita el proceso de filtración, contribuyendo a mayor rendimiento de la bebida y obteniendo una mayor limpieza ya que las levaduras están confinadas, evitándose así grandes masas.

Puig<sup>74</sup> señala que la velocidad de fermentación es más rápida con levaduras inmovilizadas y esto podría atribuirse a la mejor adaptación al medio.

En la investigación realizada por Gutiérrez<sup>75</sup> reportó 4-5%, mientras que en estudios realizados con guanábana Pantoja<sup>73</sup> reportó de 4.2% a 4.6 % en grado alcohólico; siendo estos muy diferentes con el obtenido en esta investigación, según norma internacional el grado alcohólico debe estar entre 3-8%.

Los pellets de pectina-gelatina fueron reutilizados 2 veces adicionales para la obtención de la bebida fermentada, consiguiéndose un producto con las mismas características, además los pellets no perdieron su actividad, lo que demuestra que es posible reusarlas.



## CONCLUSIONES

### PRIMERA:

En el presente trabajo de investigación se logró obtener pectina a partir de la cascarilla del *Theobroma cacao Linnaeus* por el método de hidrólisis usando ácido cítrico a una temperatura de 75 °C y un tiempo de 75 minutos, mediante pruebas físico químicas y cuantitativas se caracterizó e identificó como pectina de baja metoxilación, la cual se empleó para la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* realizando mezclas de pectina – gelatina; los pellets obtenidos se utilizaron en la fermentación del mosto de manzana.

### SEGUNDA:

Se evaluaron dos métodos para la extracción de la pectina: convencional y ácido cítrico, en este último se variaron los parámetros de temperatura y tiempo; resultando óptimo el método del ácido cítrico a una temperatura de 75 °C por 75 minutos usando a un pH 3.

**TERCERA:**

Se evaluaron las características fisicoquímicas de la pectina, obteniéndose un contenido de metoxilos de 7.21%, con un peso equivalente de 452.03 mg/meq, grado de esterificación de 51.22%, un contenido de ácido anhidrogalacturónico de 79.90%, y presentando un rendimiento de 2.31g/100g de cascarilla; lo que demuestra que el tipo de pectina obtenida es de baja metoxilación, estas pectinas requieren de la presencia de iones calcio y de pH entre 2.8 y 6.5 para formar geles.

**CUARTA:**

Se evaluó la cantidad de carbohidratos totales, obteniéndose un resultado de 47.91g/100g; lo que indica que la estructura de la pectina está constituida por una cantidad menor de monómeros de ácido anhidrogalacturónico además de tener presencia de azúcares libres.

Asimismo, se evaluó la cantidad de fenoles totales, consiguiéndose un resultado de 3.7g/100g; lo que le da a la pectina extraída una coloración café clara debido a la presencia de los fenoles presentes en la cascarilla de cacao.

**QUINTA:**

Se inmovilizó *Saccharomyces cerevisiae* mediante el método de gelificación iónica, empleando mezclas de pectina y gelatina siendo los porcentajes óptimos: 75% - 25% respectivamente, a esta matriz polimérica se denominó pellet; los cuales se evaluaron físicamente para determinar su estabilidad, observándose una forma ovoide con presencia de pequeñas extensiones y un diámetro promedio de 0.40 centímetros.

**SEXTA:**

Se evaluó la capacidad de fermentación de las levaduras inmovilizadas a través de la medición de los grados Brix en el mosto de manzana, reduciéndose el tiempo de adaptación de las levaduras por lo que el tiempo de fermentación duró 14 días; además se calculó el grado alcohólico de la sidra obtenida, siendo su valor 6.1%. Se comprobó que es posible la reutilización de los pellets a escala laboratorio hasta en tres fermentaciones consecutivas.

## RECOMENDACIONES

### **PRIMERA:**

En el método de Dubois, es necesario hacer una previa agitación de 10 segundos después de haber agregado el ácido sulfúrico para su interacción con los carbohidratos; el tiempo de reposo debe ser exacto, por ello se deben preparar las muestras con un intervalo de tiempo entre 5 a 10 minutos para que ocurra la reacción y se obtenga una lectura adecuada. Lavar las celdas con isopropanol para eliminar restos orgánicos.

### **SEGUNDA:**

En el método de Folin Ciocalteu, secar en la estufa el Carbonato de sodio antes de usarlo, una vez preparado utilizarlo totalmente, el reactivo de Folin Ciocalteu debe permanecer refrigerado ya que se descompone rápidamente.

Asimismo, en la prueba es recomendable tomar en cuenta el tiempo de reposo antes de la lectura en el espectrofotómetro, ya que de no cumplirse obtenemos un resultado erróneo. Los patrones y la muestra antes de su lectura deben ser agitados en el vórtex, para precipitar los sólidos presentes causantes de las interferencias que dan un falso positivo.

**TERCERA:**

En la formación de los pellets pectina-gelatina, se sugiere emplear el microscopio electrónico de barrido (SEM) para visualizar la posible presencia de levaduras sobre la superficie de los pellets y realizar un lavado en Buffer Acetato pH 5.

**CUARTA:**

Realizar la prueba de cromatografía en capa fina para poder verificar los componentes presentes en la muestra de pectina, usando estándares como ramnosa, glucosa, arabinosa, galactosa y ácido D-Galacturónico.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cacao História e Evolução [Homepage em internet]. Brasil. [Revisado en julio del 2017]. Disponible en: [www.ceplac.gov.br/radar/radar\\_cacao.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacao.htm)
2. Suárez DL; Orozco DM. Obtención y Caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao del *Theobroma Cacao L.*, subproducto de una industria chocolatera nacional [Tesis]. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología; 2014.
3. Barazarte H, Sangronis E, Unai E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) una posible fuente comercial de pectinas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2008; 58(1): 64-70.
4. Vriesmann LC. Pectinas da casca dos frutos do cacau (*Theobroma cacao L.*): Otimização da extração e caracterização [Dissertação Doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica; 2012.
5. Ortiz KL. Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao sobre algunas propiedades químicas y biológicas en el suelo de una finca cacaotera, Municipio de Yaguará (Huila) [Tesis Maestría]. Manizales: Universidad de Manizales. Facultad de ciencias contables, económicas y administrativas; 2013.
6. Chacón I, Ramis C, Gómez C. Descripción morfológica de frutos y semillas del cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao L.*) en el Sur del Lago de Maracaibo Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2011; 28 Supl. 1: 1-13.
7. Cacao Peruano. Chuncho Cusco. Asociación Peruana de Productores de Cacao (APPCACAO). Disponible en: <http://appcacao.org/cacao-peruano/>
8. García LF. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. [Informe Final]. Lima: M & O Consulting S.A.C.; 2008.

9. Superárboles de Cacao Chuncho del Cusco – Sistematización del primer concurso regional en el distrito de Echarate. Ministerio de Agricultura. APPCACAQ.
10. Oblitas JD. Producción orgánica de Cacao (*Theobroma cacao*) en el valle del río Apurímac, Ene y Mantaro (VRAEM) [Monografía]. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Agronomía; 2015.
11. Baena LM, García NA. Obtención y Caracterización de fibra dietaria a partir de cascarilla de las semillas tostadas de *Theobroma Cacao L.* de una industria chocolatera colombiana [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías; 2012.
12. Soto MJ. Desarrollo del proceso de producción de la cascarilla de semilla de cacao en polvo destinado al consumo humano [Tesis]. Venezuela: Universidad Simón Bolívar; 2012.
13. Salazar D. Efecto de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao*) sobre los índices productivos en cuyes (*Cavia porcellus*) [Tesis]. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2017.
14. Pagan J. Degradación enzimática y características físico químicas de la pectina del bagazo de melocotón [Tesis]. Salamanca: Universitat de Lleida.
15. Sainz R. Maceración enzimática de tejidos vegetales. Acción de protopectinasa de *Geotrichum Klebahnii* sobre cascara de pomelo [Tesis]. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Departamento de Ciencia y Tecnología; 2008.
16. Navarro S. Navarro S. Sustancias Pécicas: Química y Aplicaciones. Madrid: Universidad de Murcia. EDITUM; 1985.
17. Pectinas Propriedades e aplicações. Food Ingredients Brasil. 2014 (29):46-56.

18. Contreras JC. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Apergillus kawachii* [Tesis]. Argentina. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas; 2003.
19. Canteri MH, Gilvan LM, Scheer A. Pectina: da Matéria prima ao Produto final. *Polímeros*, 2012; 22 (2): 149-157.
20. Chasquibol N, Arroyo E, Morales JC. Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial* 2008; 26: 175-199.
21. Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. *Fisiología e Desenvolvimento Vegetal*. 6a ed. Brasil. Artmed Editora; 2017. p. 370 – 371.
22. Telesca M. Pectina: Características e Aplicações em Alimentos [Tesis]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Departamento de Ciência dos Alimentos; 2008.
23. Sánchez D, Aguilar CN, Contreras JC, Nevárez GV. Moléculas pécticas: extracción y su potencial aplicación como empaque. *Tecnociencia Chihuahua*. Mayo-agosto 2011; 5(2): 76-82.
24. Baltazar R, Carbajal D, Baca N, Salvador D. Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Universidad Nacional de Trujillo. Agroind Sci*. 2013; 3(2): 77-89.
25. Fishman M, Chau H, Hoagland P, Hotchkiss A. Microwave assisted extraction of lime pectin. *Food Hydrocolloids*. 2006; (20):1170-1177.
26. Moreno C. Práctica N° 3: Extracción y Caracterización de Pectinas. Universidad Nacional del Santa. Facultad de Ingeniería. *Procesos Agroindustriales*; 2014.

27. Owens HS, Miers JC, Maclay WD. Distribution of molecular weights of pectin propionates. *J. Colloid. Sci.* 1948; 3: 277-291.
28. Lozada KJ. Determinación de parámetros tecnológicos para la obtención de pectina a partir del mucílago – subproducto de papaya arequipeña (*Carica papaya pubescens*) mediante métodos físico químicos [Tesis]. Arequipa: Universidad Católica de Santa de María. Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas; 1998.
29. Capelo MJ, Pérez ME. Determinación de carbohidratos totales en bebidas analcohólicas consumidas por adolescentes en la ciudad de Cuenca y Nabón [Tesis]. Cuenca: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas; 2011.
30. Cruzado M, Pastor A, Castro N, Cedrón JC. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus L.*). *Rev. Soc. Quím. Perú.* Ene/mar 2013; 79(1): 57-63. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n1/a08v79n1.pdf>
31. Elejalde E. Aplicación de métodos espectroscópicos al estudio de las características cromáticas de los componentes polifenólicos presentes en vinos. *Formula.* 1999; (5):39-66.
32. Jiménez P, Girbes T. Determinación del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo de Folin-Ciocalteu. *Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición.* Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina Curso 2012-2013: 1-11.
33. Malajovich MA. Guías de actividades 10. Bioprocesos - Inmovilización de células en alginato. Disponible en: [www.bteduc.bio.br](http://www.bteduc.bio.br).

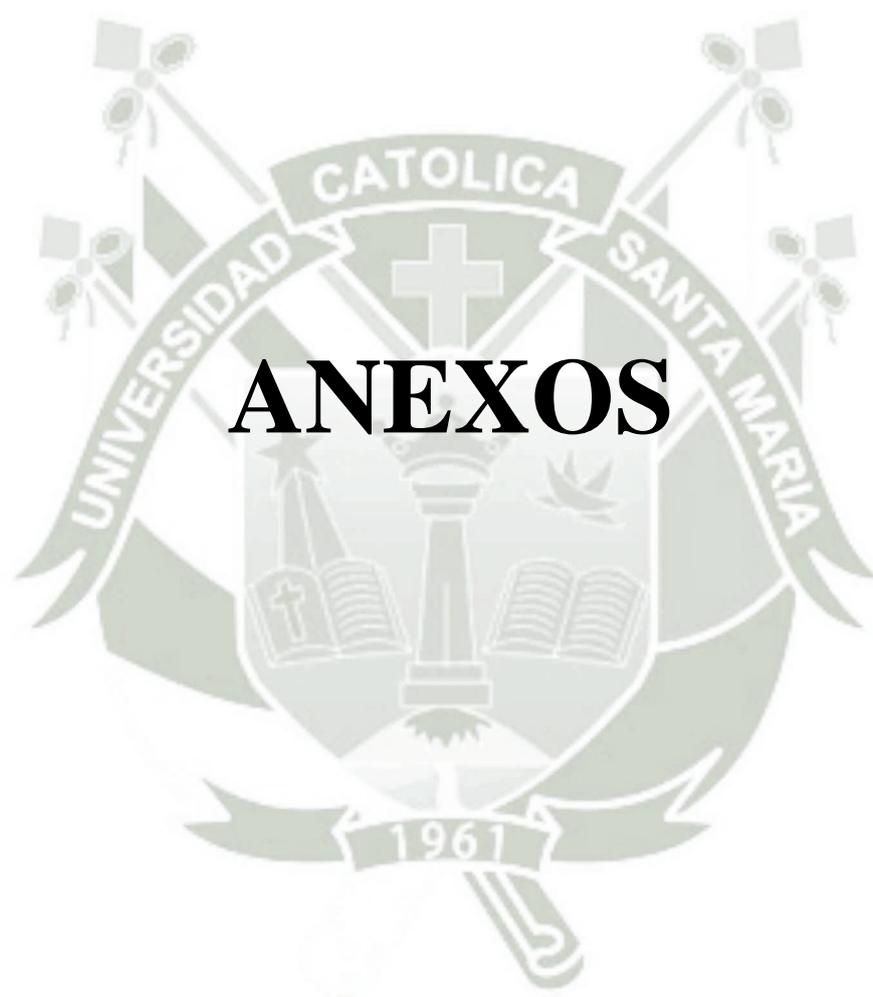
34. Ochoa R, Osuna JA, Villa C, Escalante P, Ibarra V. Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2011; 3(6): 42-56.
35. López OD. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersion. *Revista Cubana de Farmacia*. 2010; 44(3): 381-389.
36. Esquivel A. Desarrollo y Caracterización de Nanopartículas a base de Zeína estabilizadas con pectina y B-Lactoglobulina [Tesis]. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química; 2013.
37. Tello F. Partículas de Alginato e pectina produzidas por gelificação iônica e recobertas com proteínas [Dissertação Doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2014.
38. Lupo B, González C, Maestro A. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Enero-junio 2012; 3(1): 130-151.
39. Bonini KF. Complexo pectina/caseína: aspectos básicos y aplicados [Dissertação Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2007.
40. Braccini I, Pérez S. Molecular Basis of  $\text{Ca}^{2+}$  induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*. 2001. 2(4): 1089-1096.
41. Mundo Educação [Página en internet]. Brasil. [Revisado en diciembre del 2017]. Disponible en: [www.mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/fermentacao.htm](http://www.mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/fermentacao.htm).

42. Brasil Escola [Página en internet]. Brasil. [Revisado en diciembre del 2017]. Disponible en: [www.brasilecola.uol.com.br/o-que-e/quimica/o-que-e-fermentacao.htm](http://www.brasilecola.uol.com.br/o-que-e/quimica/o-que-e-fermentacao.htm)
43. Puerta GI. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Avances Técnicos Cenicafé. Diciembre 2010; (402): 1-12.
44. Biotecnología. Testigos de las tecnologías de la biología molecular y celular. [Página en internet]. España. [Revisado en diciembre del 2017]. Disponible en: <https://biotecnologia.fundaciontelefonica.com/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/>.
45. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. March 1956; 28(3):350-356.
46. Rao P, Pattabiraman TN. Reevaluation of the Phenol-Sulfuric Acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. Analytical Biochemistry. 1989; 181:18-22.
47. García JR, De la Rosa LA, Herrera B, González AG, López JA, González GA, et al. Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. Tecnociencia Chihuahua. Mayo-agosto 2011; 5(2):67-75.
48. Libkind D, Tognetti C, Moliné M. Curso Teórico-Práctico sobre microscopia y recuento de levaduras para productores de cerveza. Argentina: Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA).
49. Aprende a catar vino. Refractómetro de campo. Consultado 31 de octubre. Publicado el 21 de Setiembre del 2009. Disponible en <https://aprendeacatarvino.wordpress.com/2009/09/21/refractometro-de-campo/>

50. NTP 210.003:2003 BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Determinación del grado alcohólico volumétrico. Método por picnometría.
51. Vriesmann LC, Teófilo RF, Petkowicz CL. Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao L.*) with citric acid. LWT- Food Science and Technology 2012; 49: 108-116.
52. Munhoz CL, Sanjinez EJ, Soares MS. Extração de pectina de goiaba desidratada. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. Jan/Mar 2010; 30(1).
53. García JI. Evaluación del rendimiento de extracción de pectina en aguas mieles del beneficiado de café procedentes de desmucilaginado mecánico [Tesis]. San Salvador. Universidad de el Salvador. Facultad de Ingeniería y Arquitectura; 2009.
54. Chan Y, Choo W. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. Food Chemistry. 2013; 141(4):3752-3758.
55. Devia JE. Proceso para producir pectinas cítricas. Revista Universidad EAFIT. Enero-febrero-marzo 2003(129): 21-29.
56. Untiveros GS. Obtención y caracterización de pectinas de alto y bajo metoxilo de la manzana variedad Pachacamac. Rev. Soc. Quím. Perú. 2003; 69(3): 155-162.
57. Adomako D. Cocoa pod husk pectin. Phytochemistry. 1972; 11: 1145-1148.
58. Guerrero GE, Suárez DL, Orozco DM. Implementación de un método de extracción de pectina obtenida del subproducto agroindustrial cascarilla de cacao. Temas Agrarios. Enero - junio 2017; 22 (1):87-92.
59. D'Addosio R. Páez G, Marín M, Mármol Z, Ferrer J. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2005; 22(3):240-249.

60. Mendoza L, Jimenez J, Ramirez M. Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cascaras del fruto del cacao. Revista. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. Enero-junio 2017; 20(1): 131-138.
61. Nielsen SS. Food Analysis Laboratory Manual. Indiana: Springer; 2010. 47p.
62. Romero C, Zambrano A. Análisis de azúcares en pulpa de cacao por colorimetría y electroforesis capilar. Revista Científica UDO Agrícola. 2012; 12(4): 906-913.
63. Oliveira MA. Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma cacao*). Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; 2005.
64. Rangel SX, García J, Orrego CE. Inmovilización de lipasa de *Candida antarctica* sobre soportes de quitosano-gelatina. Rev. Colomb. Quim. 2011; 40(2): 149-164.
65. Dos Santos R. Imobilização de Lipases em gel de pectina [Dissertação Mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Pós-Graduação em Química; 2003.
66. Alves, AP. Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina pelo método de emulsificação/gelificação interna a albumina como fármaco modelo [Dissertação Mestrado]. Coimbra: Universidade de Coimbra. Faculdade de Farmácia; 2004.
67. Castillo SL, Alvarado JM, Baez JG, Macías E, Ramírez-Baca P, Candelas-Cadillo MG, *et al.* Diseño de microcápsulas de alginato con matriz prebiótica de aloe vera para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2017; 2:531-536.
68. Alvarado LM, Tacanga D, García A. Informe de Práctica 1: Determinación de biomasa. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2015.

69. Hernández SA. Uso, manejo y preservación de los recursos naturales [Tesis Maestría]. La Paz Baja California Sur. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. Programa de estudios de posgrado; 2011.
70. De Andrade M. Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica [Dissertação Mestrado]. Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Engenharia Química; 2005.
71. Pereda MA. Elaboración de sidra natural ecológica. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 199. 65p.
72. Real Decreto 72/2017. Boletín Oficial del Estado, n° 44, (10 -02-2017).
73. Pantoja L, Nobuyuki R, Da Silva SM, Lopes JP, Monteiro FM, Alves Q, *et al.* Aproveitamento biotecnológico da graviola na elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada em alginato de cálcio. *Brazilian Journal of Food Technology*. Março 2005; (5) SIPAL: 96-102.
74. Puig A, Bertran E, Vilavella M, García T, Mauricio JC, Minguez S. Levaduras inmovilizadas: Evaluación de su potencial enológico. En: VII Foro Mundial del Vino. España. Mayo 2010.
75. Gutiérrez MR, Tudela E, López L. El manzano de Sidra; producción y transformación. Cantabria: Imprenta Regional de Cantabria; 2016. 46p.



# ANEXOS



## CACAO “CHUNCHO” (CUSCO)

### CARACTERIZACION ORGANOLEPTICA<sup>1</sup>

Las principales características organolépticas resultantes de la evaluación sensorial de este cacao nativo es como sigue:

Perfil sensorial: Notas de floral, frutal, nuez y otros sabores positivos; con baja astringencia y amargor.

*Análisis sensorial de pastas de cacao*  
Rangos de puntuación otorgados para cada uno de los atributos positivos y negativos

ATRIBUTOS SENSORIALES	CHUNCHO
<b>POSITIVOS</b>	
Sabor a cacao	2.8 – 4.0
Acidez cítrica	1.9 – 3.5
Frutal	1.1 – 2.5
Floral	0.3 – 4.0
Nuez	0.5 – 2.4
Malta	0.1 – 1.3
Aroma Positivo	0.6 – 3.0
<b>NEGATIVOS</b>	
Acidez acética	0.6 – 2.5
Acidez láctica	0.0 – 1.6
Acidez butírica	0.0 – 0.6
Astringencia	2.5 – 3.6
Amargo	2.4 – 4.5
Sabor a crudo	0.0 – 0.5
Aroma negativo	0.0 – 1.0
<b>PUNTAJE TOTAL</b>	<b>11.1 – 23.6</b>

Evaluación sensorial de la parcela del Sr. Sixto Calderón Roque

<sup>1</sup> Resultado de la evaluación sensorial realizada por Rosario Rojas y colaboradores de a la **Universidad Peruana Cayetano Heredia** y la **Red Nacional de Catadores de Cacao del Perú**.

La evaluación y la caracterización fueron financiadas en el marco del proyecto *Estudio del proceso postcosecha y Caracterización morfológica-sensorial-molecular de 3 variedad de cacaos nativos de Cusco, Junín y Piura*, (Contrato 071-FINCYT-FIDECOM-PIPEA-2012), ejecutado por APPCACAO.

## CARACTERIZACION MORFOLOGICA<sup>2</sup>

### FRUTO:

Forma básica: elíptico y oblongo

Constricción basal: intermedio y ausente

Forma del ápice: obtuso

Rugosidad: ligero e intermedio

Profundidad del surco: intermedia y superficial

Color al estado inmaduro: verde y verde pigmentado

### SEMILLA:

Forma en sección longitudinal: oblonga y elíptica

Forma en sección transversal: aplanada e intermedia

Color de cotiledón: morado

## VARIEDADES DE MAZORCAS DEL CACAO “CHUNCHO”



---

<sup>2</sup> Resultado de la caracterización morfológica realizada por Luis García Carrión de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en el distrito de Echarate, Cusco.

La evaluación y la caracterización fueron financiadas en el marco del proyecto *Estudio del proceso postcosecha y Caracterización morfológica-sensorial-molecular de 3 variedad de cacao nativos de Cusco, Junín y Piura*, (Contrato 071-FINCYT-FIDECOM-PIPEA-2012), ejecutado por APPCACAO.

## COOPERATIVAS SOCIAS DE APPCACAO QUE PRODUCEN CACAO “CHUNCHO”

- Cooperativa Agraria Cafetalera Alto Urubamba Ltda. – CAC Alto Urubamba <http://cac-altourubamba.blogspot.pe/>
- Asociación de productores de cacao de los Valles de Convención e Yanatile – APROCAV

Existen otras cooperativas que producen cacao “Chuncho”



La evaluación y la caracterización fueron financiadas en el marco del proyecto *Estudio del proceso postcosecha y Caracterización morfológica-sensorial-molecular de 3 variedad de cacaos nativos de Cusco, Junín y Piura*, (Contrato 071-FINCYT-FIDECOM-PIPEA-2012), ejecutado por APPCACAO.

## ANEXO 2

### GLOSARIO

*Ácido galacturónico:* Monosacárido correspondiente a la forma oxidada de la D-galactosa. Es el principal componente de las pectinas.

*Biopolímero:* Son sustancias poliméricas naturales con peso molecular alto, con gran tamaño y forma alargada que constituyen las paredes celulares de células animales y vegetales.

*Caja de huevos:* Proviene del inglés egg-box, es el modelo por el cual se describe la interacción entre los cationes y los grupos carboxílicos.

*Cromóforo:* Grupos funcionales de la molécula responsables de la absorción de energía o luz visible para emitir color, principalmente son dobles y triples enlace carbono-carbono, sistemas aromáticos, grupos carbonilo, imino (C=N), nitro y enlaces C-Y (Y es un átomo con pares libres).

*Cromógenos:* Nombre dado a ciertas sustancias que contienen un cromóforo y bajo diversas influencias como la oxidación origina productos coloreados.

*Dimerización:* Reacción química en la que dos moléculas de subunidades idénticas (monómeros) forman una estructura química única, denominada dímero.

*Encapsulación:* Es la tecnología mediante la cual se logra confinar compuestos activos dentro de una matriz polimérica. Esta técnica crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior.

*Esterificación:* Proceso por el cual se sintetiza un éster. Un éster es un compuesto derivado formalmente de la reacción química entre un oxácido y un alcohol.

*Gemación:* Del latín *geminus* "gemelo" es un tipo de reproducción asexual. Es una división desigual, consiste en la formación de prominencias sobre el individuo progenitor, y que al crecer y desarrollarse, originan nuevos seres que pueden separarse del organismo parental o quedar unidos a él, iniciando así una colonia.

*Hidratos de Carbono:* Son compuestos orgánicos que presentan carbono, hidrogeno y oxígeno.

*Hidrólisis:* Reacción química en la cual una sustancia neutra (como las moléculas orgánicas) o iónica (como las sales) es descompuesta por acción del agua.

*Higroscopicidad:* Es la capacidad para absorber la humedad atmosférica.

*Metoxilo:* Un grupo funcional consistente en un grupo metilo unido a un oxígeno, con fórmula:  $-O-CH_3$ .

*Metoxilación:* Es el proceso por el cual se adiciona uno o más grupos metoxi.  $-O-CH_3$ .

*Monosacáridos:* Azúcares simples, son los glúcidos más sencillos que contienen de tres a seis átomos de carbono. Su fórmula empírica es  $(CH_2O)_n$  donde  $n \geq 3$ .

*Oligosacáridos:* Polímeros de monosacáridos con un número de unidades monoméricas entre 2 y 10.

*Pectatos:* Sales de los ácidos pectícos (ácidos pectínicos desmetoxilados); sus propiedades y usos son comparables a los de las pectinas.

*Pectinatos:* Sales de los ácidos pectínicos (ácidos poligalacturónicos parcialmente metoxilados).

*Pedicelo:* Es la estructura que une a la flor o al fruto con la rama que la sostiene o con otra estructura más compleja. También se le conoce como pedúnculo.

*Pellets:* Esferas sólidas formadas por un polímero o la combinación de ellos, con tamaño en milímetros para el almacenamiento en su interior de un microorganismo o de un principio activo.

*Polisacáridos:* Biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos y se encuentran en la pared celular de las plantas.

*Polifenoles:* Son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en las plantas, caracterizados por la presencia de más de un grupo fenol por molécula.

*Polimerización:* Son reacciones químicas en las cuales un monómero iniciador o endurecedor activa a otro monómero comenzando una reacción en cadena la cual forma el polímero final.

*Proteína:* Son moléculas formadas por aminoácidos que están unidos por un tipo de enlaces conocidos como enlaces peptídicos.

*Reticulación:* Es una reacción química mediante la cual los polímeros se unen en cadenas tridimensionales componiendo una especie de red que vuelve más estable al material.

*Sidra:* Bebida alcohólica de baja graduación, espumosa y agrisada que se obtiene por fermentación del jugo de manzana.



## ANEXO 3

## PREPARACIÓN DE BUFFER

## 1. BUFFER FOSFATO

Soluciones Stock

A: Solución de Fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8 g en 1000 mL)

B: Solución de Fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o 71.7g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1000 mL)

x mL de A + y mL de B, diluir a un volumen total de 200 mL

x	y	pH	x	y	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

## 2. BUFFER ACETATO

Soluciones Stock

A: Solución de Ácido acético 0.2 M (11.5 mL en 1000 mL)

B: Solución de Acetato de sodio 0.2 M (16.4 g de  $C_2H_3O_2Na$  o 27.2 g de  $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$  en 1000 mL)

x mL de A + y mL de B, diluir a un volumen total de 100 mL

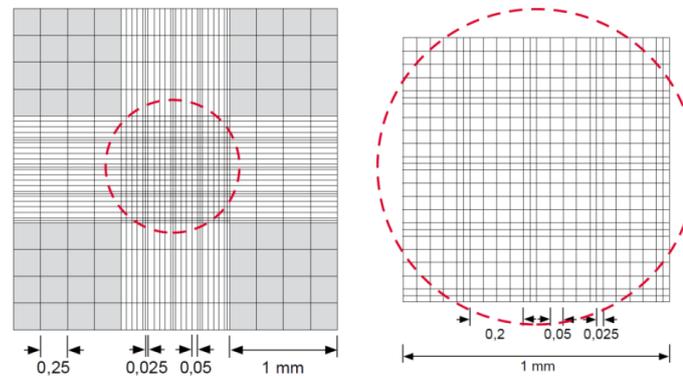
x	y	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.5	5.4
4.8	45.2	5.6

## ANEXO 4

### RECuento CELULAR EN CÁMARA DE NEUBAUER

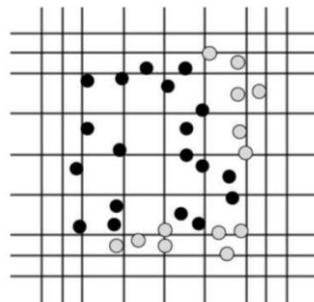
#### PROCEDIMIENTO

- Para cargar la cámara, primero el cultivo debe estar bien homogenizado, se coloca la muestra entre el espacio entre la cámara y el cubreobjetos y se espera a que sedimente durante unos segundos.
- Se ubica en el microscopio en el sector donde se realiza el conteo, el cual se sitúa en el centro, como se muestra en la **Fig. 40**.

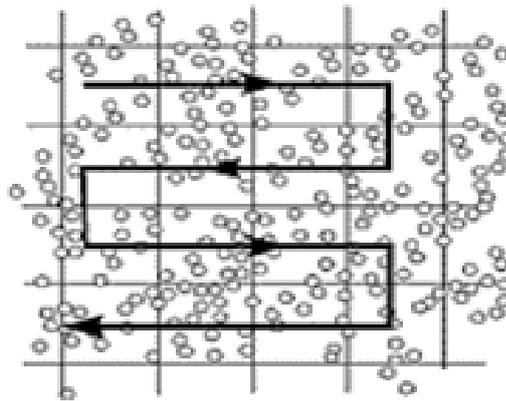


**Figura 40. Sector de conteo de la cámara de Neubauer**

- Al realizar el conteo, se tiene en cuenta las levaduras que están en negrita observadas en la **Fig. 41**, las levaduras que se encuentran en el borde derecho no se cuentan y las que están en gemación se cuentan como media levadura (**Fig. 42**).



**Figura 41. Conteo de células**



**Figura 42. Orden de conteo en zig-zag**

- La fórmula para calcular el número total de células en la cámara de Neubauer es la siguiente:

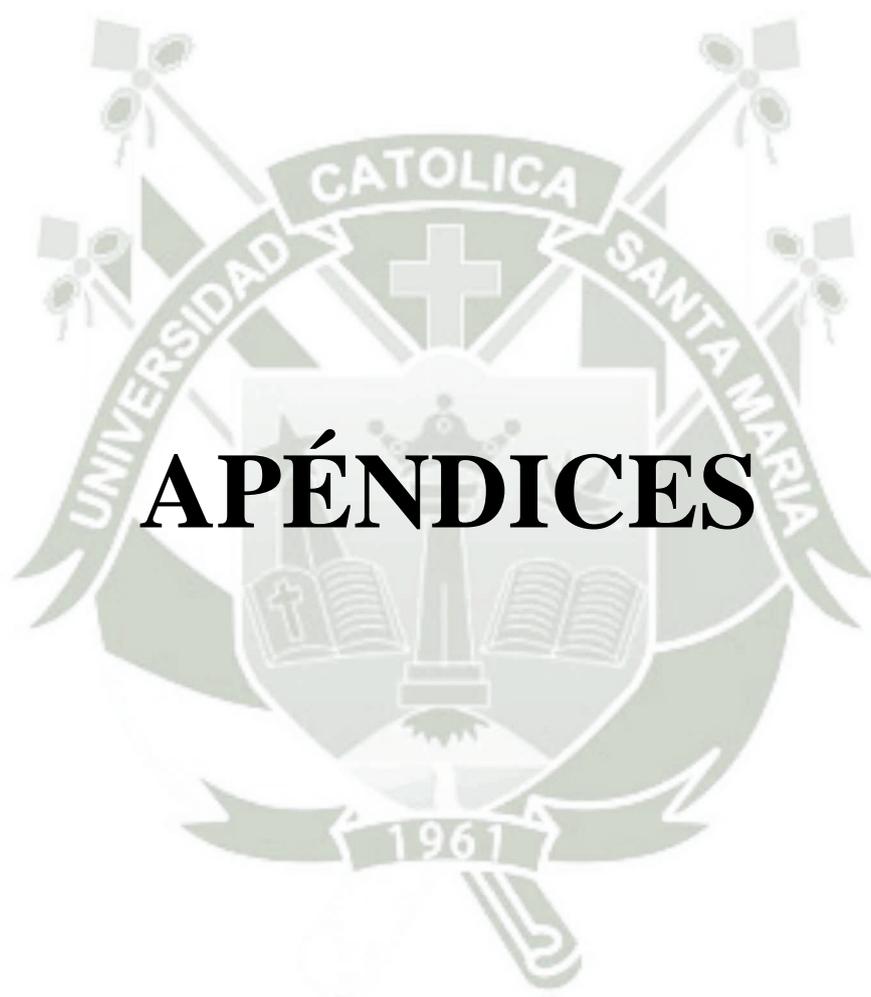
$$N^{\circ} \text{ de levaduras (UFC/mL)} = \frac{\text{Número de levaduras contadas en los 5 cuadrantes}}{\text{Área contada} \times \text{Altura de la cámara}}$$

- Se debe tener los siguientes cuidados con la cámara de recuento:
  - ❖ Inmediatamente después de usar es muy importante limpiar la cámara.
  - ❖ Primero se limpia con etanol de 70% y luego limpiar con agua.
  - ❖ Se seca con un papel suave sin frotar o con acetona.

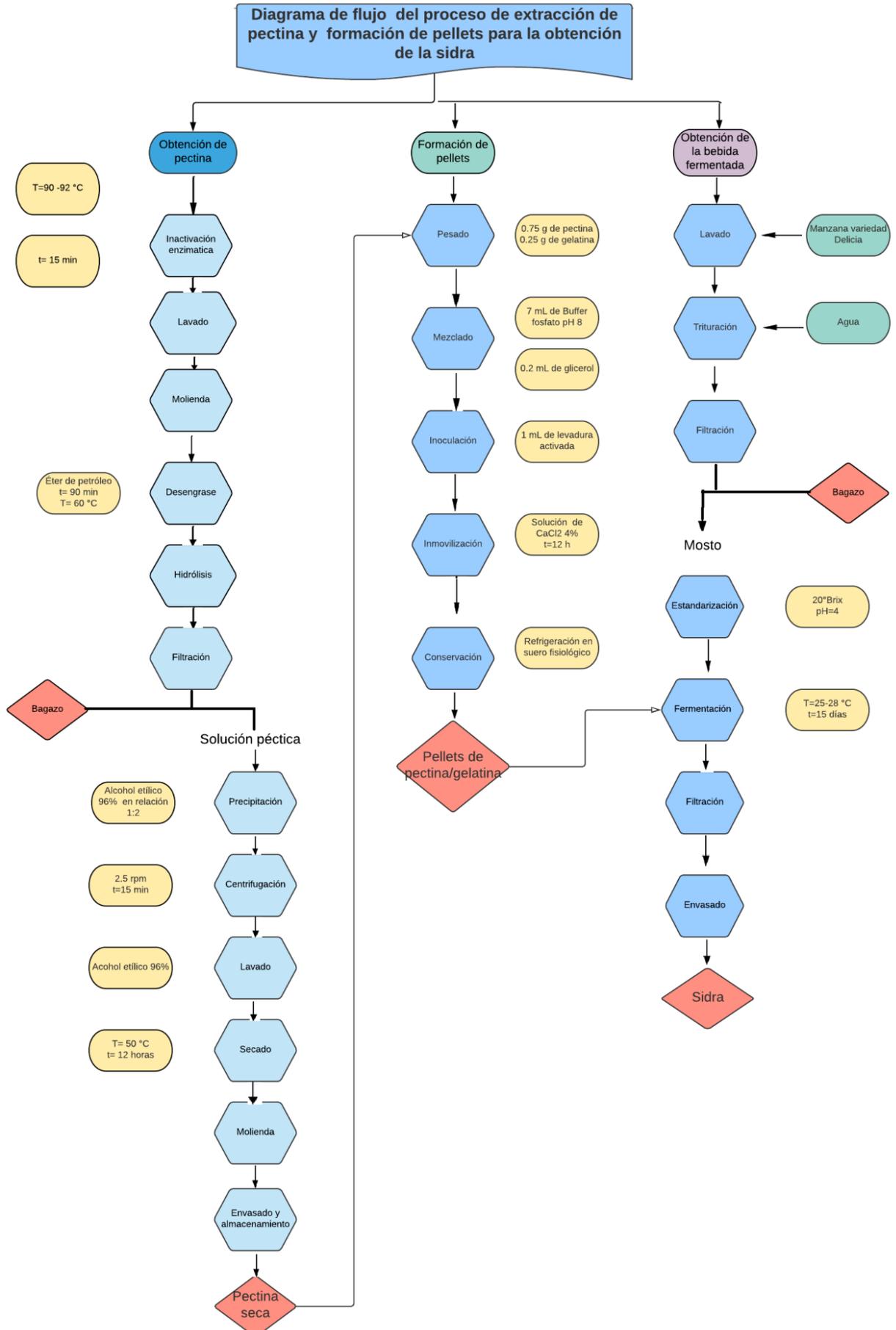
ANEXO 5

TABLA DE GRADOS ALCOHOLICOS A 20°C (Normativo)

Sp-gr a 20 °C/ 20 °C	Densidad a 20 °C, g/L	%Alc. Vol. (20 °C)
0.9942	992.41	4.0
0.9941	992.28	4.1
0.9939	992.14	4.2
0.9938	992.00	4.3
0.9937	991.87	4.4
0.9935	991.73	4.5
0.9934	991.59	4.6
0.9932	991.46	4.7
0.9931	991.32	4.8
0.9930	991.19	4.9
0.9928	991.06	5.0
0.9927	990.92	5.1
0.9926	990.79	5.2
0.9924	990.65	5.3
0.9923	990.52	5.4
0.9922	990.39	5.5
0.9920	990.26	5.6
0.9919	990.12	5.7
0.9918	989.99	5.8
0.9916	989.86	5.9
0.9915	989.73	6.0
0.9914	989.60	6.1
0.9913	989.47	6.2
0.9911	989.34	6.3
0.9910	989.21	6.4
0.9909	989.08	6.5
0.9907	988.95	6.6
0.9906	988.82	6.7
0.9905	988.69	6.8
0.9903	988.56	6.9
0.9902	988.43	7.0
0.9901	988.30	7.1
0.9900	988.18	7.2
0.9898	988.05	7.3
0.9897	987.92	7.4
0.9896	987.79	7.5
0.9895	987.67	7.6
0.9893	987.54	7.7
0.9892	987.42	7.8
0.9891	987.29	7.9



# APÉNDICES

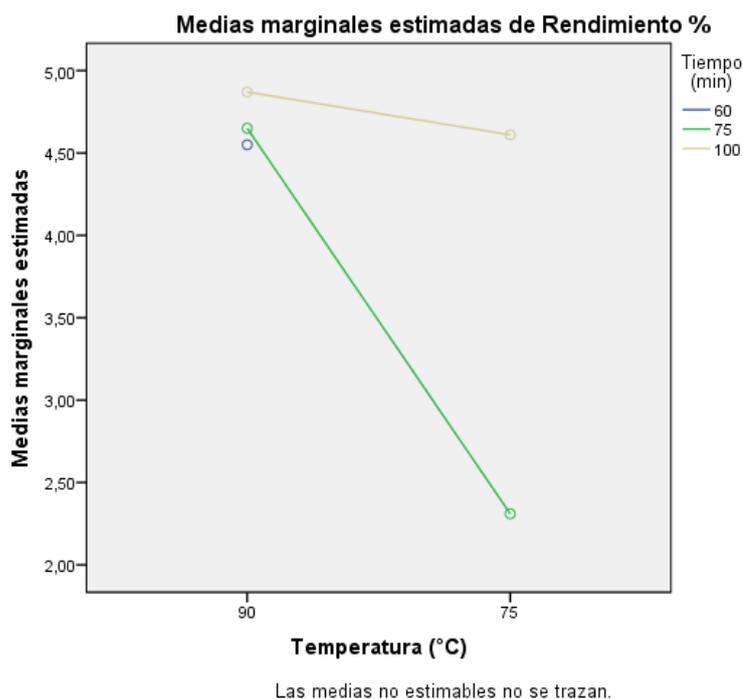


## APÉNDICE B

### ANOVA DE DOS FACTORES

#### 1. RENDIMIENTO

Se han empleado los datos de rendimiento % en base a la cascarilla desengrasada.



#### 2. CONTENIDO DE ÁCIDO ANHIDROGALACTURÓNICO

##### Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: % AAG

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	2996,232 <sup>a</sup>	4	749,058	44,074	,000
Interceptación	60368,338	1	60368,338	3551,991	,000
Temperatura	1971,716	1	1971,716	116,013	,000
Tiempo	1330,933	2	665,466	39,155	,000
Temperatura * Tiempo	620,066	1	620,066	36,484	,000
Error	169,956	10	16,996		
Total	61363,112	15			
Total corregido	3166,188	14			

a. R al cuadrado = ,946 (R al cuadrado ajustada = ,925)

Es la tabla central del análisis ANOVA de dos factores, se observa que si existe relación entre las variables (temperatura, tiempo) y el % de AAG. Se concluye que:

- a) **Temperatura:** La significación es 8,015E-7 siendo menor a 0.05, lo cual significa que existe relación o diferencias significativas entre las diferentes temperaturas y los porcentajes de AAG.
- b) **Tiempo:** La significación es 0,000019 siendo menor a 0.05, lo cual significa que existe relación entre el tiempo y los porcentajes de AAG.
- c) **Interacción Temperatura\*Tiempo:** La significación es 0,000125 resultando menor a 0.05 lo que significa que, si muestra relación con los porcentajes de AAG, es decir si hay una interacción entre temperatura y tiempo, lo que genera cambios en los % de AAG.

### 1. Temperatura (°C)

Variable dependiente: % AAG

Temperatura (°C)	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
90	55,472	1,374	52,410	58,534
75	72,512 <sup>a</sup>	1,683	68,762	76,262

a. Se basa en la media marginal de población modificada.

Como podemos ver a 90 °C, los % de AAG son menores que a 75 °C. Los intervalos de confianza muestran claramente los intervalos del promedio de 90 °C no se cruzan con los de 75 °C, el límite superior de 90 °C es 58.534, mientras que el límite inferior de 75 °C es 68.762. Por ello, nunca se trasponen y eso es una prueba más que hay una diferencia significativa entre temperatura.

## 2. Tiempo (min)

Variable dependiente: % AAG

Tiempo (min)	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
60	72,667 <sup>a</sup>	2,380	67,363	77,970
75	59,900	1,683	56,150	63,650
100	59,487	1,683	55,737	63,237

a. Se basa en la media marginal de población modificada.

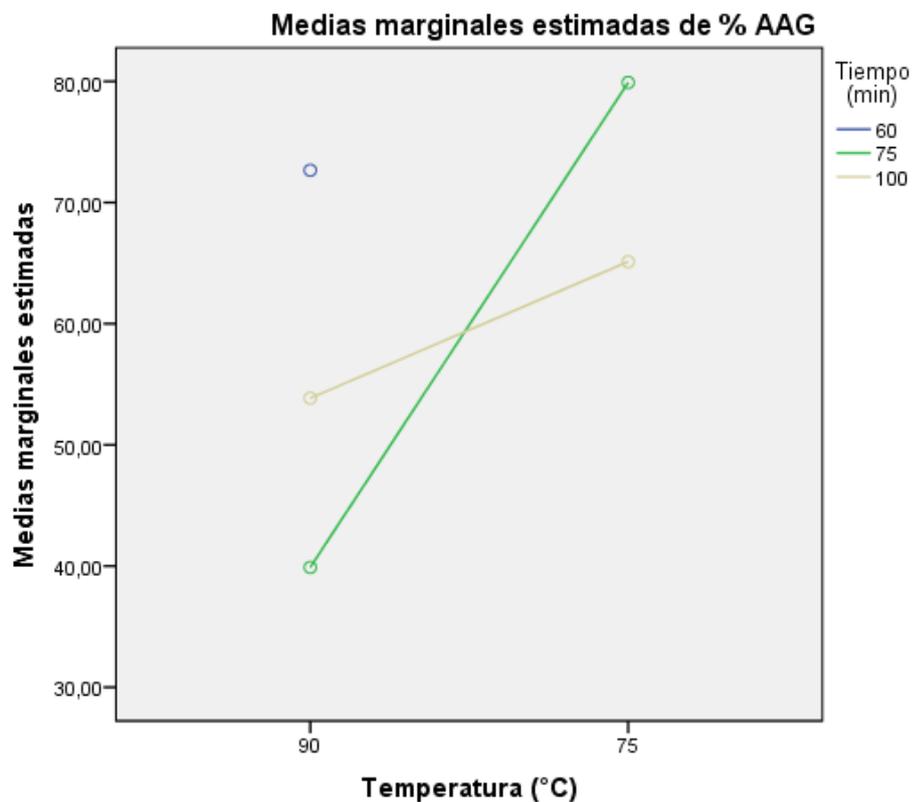
Como podemos ver a 60 minutos, los % de AAG son mayores que a 75 y 100 minutos. Los intervalos de confianza muestran claramente los intervalos del promedio de 60 minutos no se cruzan con los de 75 minutos y 100 minutos, el límite superior de 60 minutos es 67.363, mientras que el límite inferior de 75 minutos es 56.450. Por ello, nunca se traspasan siendo una prueba más que hay una diferencia significativa entre tiempo.

## 3. Temperatura (°C) \* Tiempo (min)

Variable dependiente: % AAG

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
90	60	72,667	2,380	67,363	77,970
	75	39,893	2,380	34,590	45,197
	100	53,857	2,380	48,553	59,160
75	60	.a	.	.	.
	75	79,907	2,380	74,603	85,210
	100	65,117	2,380	59,813	70,420

a. Esta combinación de niveles de factores no se observa, por lo tanto, la media marginal de población correspondiente no se puede estimar.



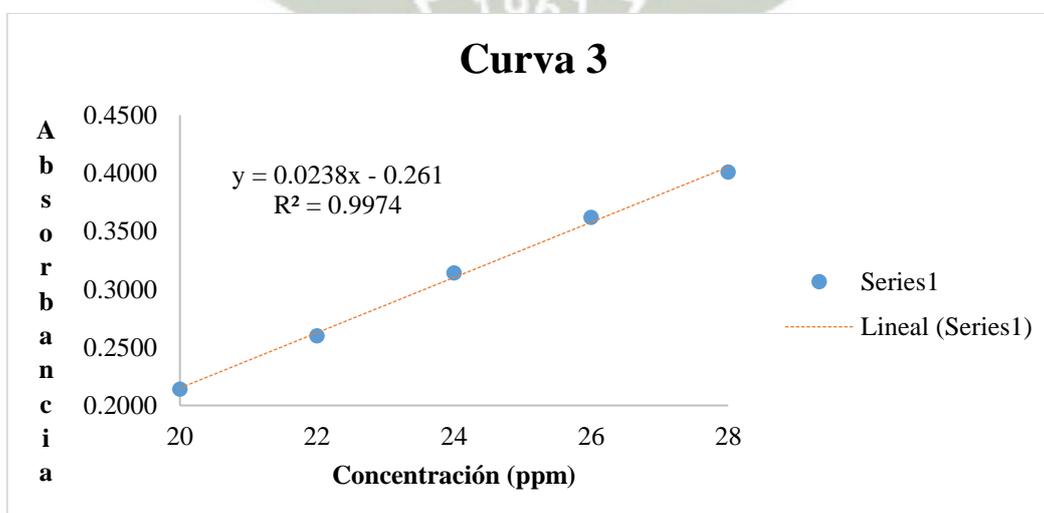
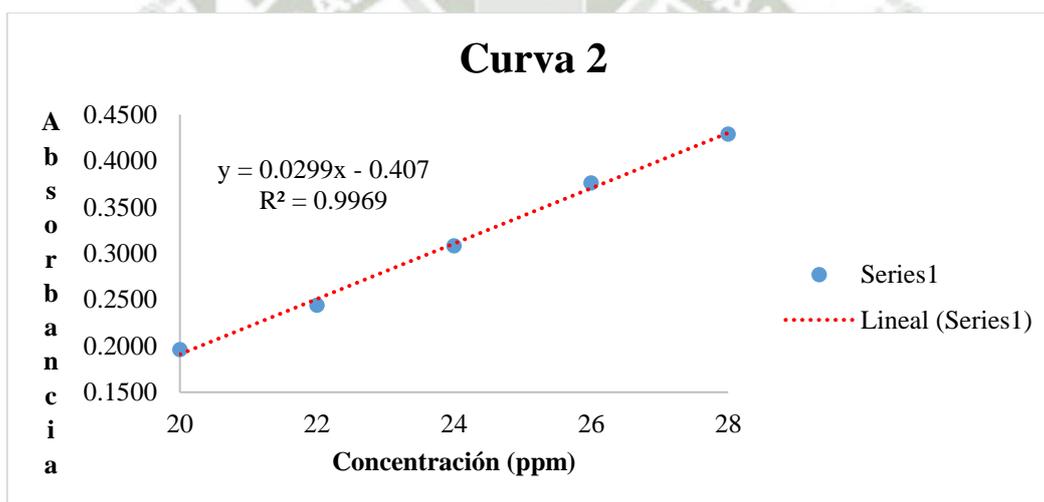
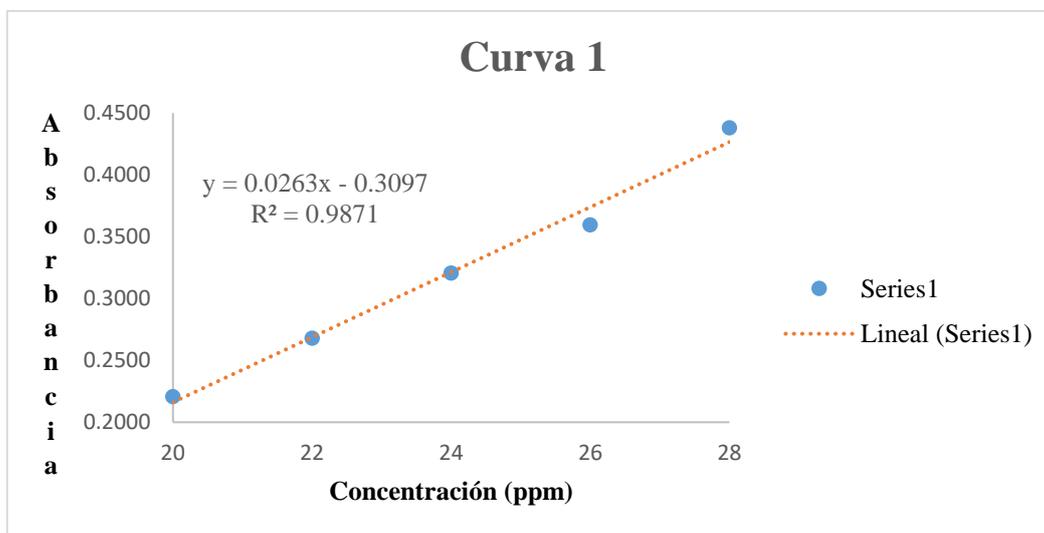
Las medias no estimables no se trazan.

Las medias marginales del lado izquierdo nos muestran los promedios de %AAG, mientras más altos los puntos más %AAG. De este gráfico podemos deducir:

- a) A 75 °C y 75 minutos se obtiene mayor % de AAG.
- b) Si hay interacción entre temperatura y tiempo, ya que las líneas llegan a cruzarse entre sí.

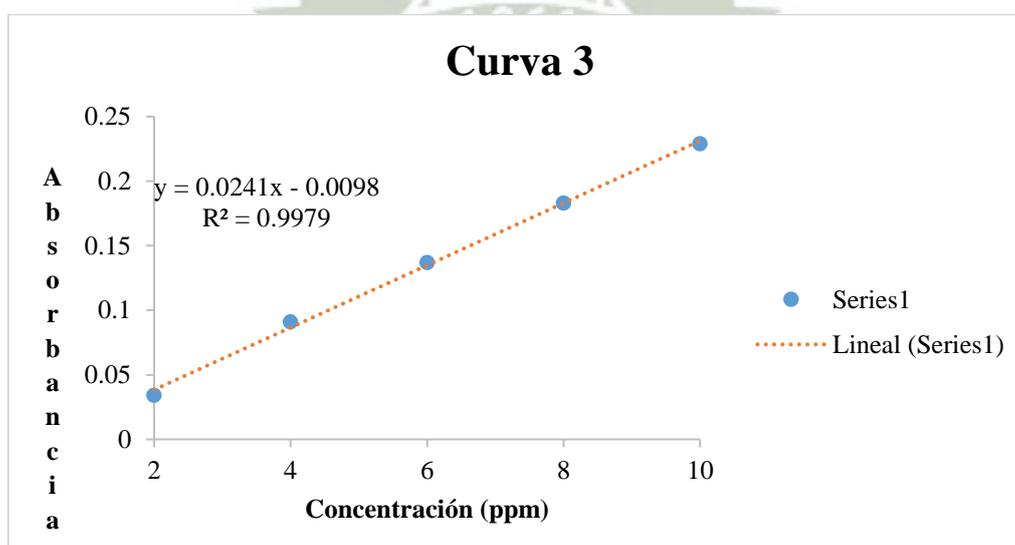
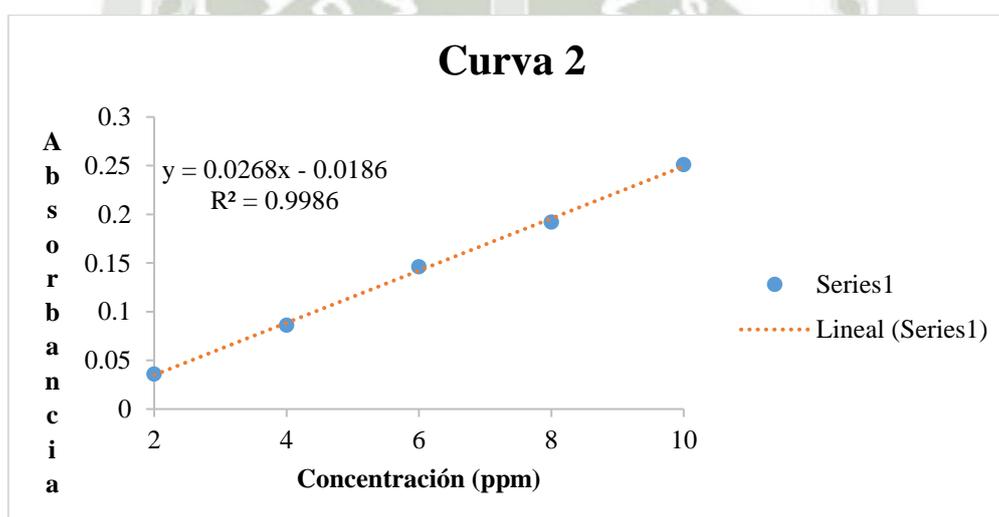
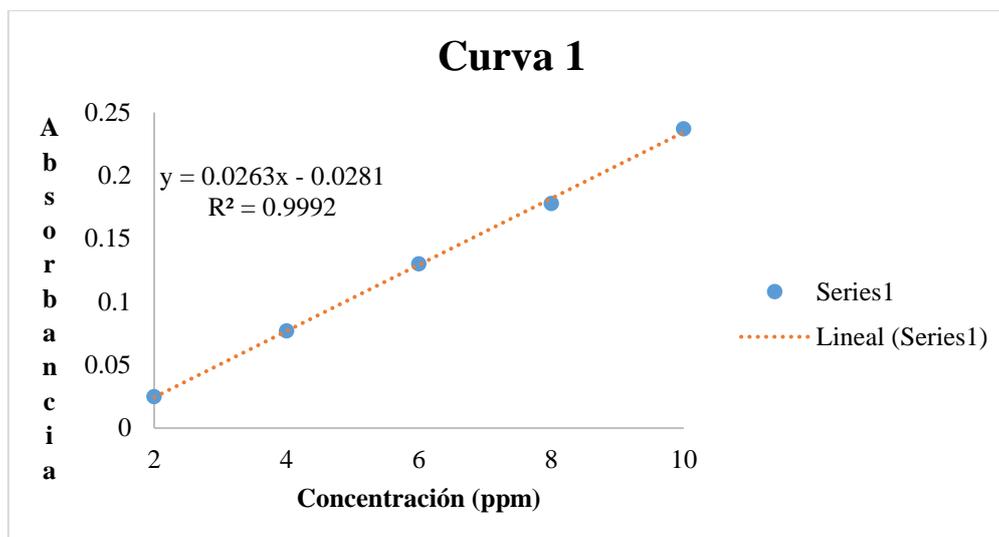
## APÉNDICE C

### CURVAS PATRONES DUBOIS



## APÉNDICE D

### CURVAS PATRONES FOLIN



## APÉNDICE E

## CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER

## A. CONTEO INICIAL

$$N^{\circ} \text{ de levaduras} \left( \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de levaduras en 5 cuadrantes}}{\text{área contada} \times \text{altura de la cámara} \times \text{dilución}}$$

Número de levaduras en 5 cuadrantes = 600

Altura de la cámara = 0.1 mm

Dilución = 0

N° de levaduras = 1 200 UFC/mL

## B. CONTEO FINAL

$$N^{\circ} \text{ de levaduras} \left( \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de levaduras en 5 cuadrantes}}{\text{área contada} \times \text{altura de la cámara} \times \text{dilución}}$$

Número de levaduras en 5 cuadrantes = 603

Altura de la cámara = 0.1 mm

Dilución = 1/10 = 0.1

N° de levaduras = 60 300 UFC/mL