



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Obtención de etanol por fermentación alcohólica a
partir del exudado de la pulpa de cacao (*Theobroma
cacao L.*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Niels Clint PACHECO HUACHACA

John Jaimito TRUJILLO DOMINGUEZ

ASESOR

Delia Yolanda WHU WHU

Mirtha ROQUE ALCARRAZ (Co-asesor)

Lima, Perú

2019

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos sinceros a aquellas personas que de un modo u otro, colaboraron con este trabajo de investigación. A mi amigo Niels Clint Pacheco, con quien compartí esta inolvidable etapa; de manera especial a nuestra asesora Delia Whu Whu, gracias por todo el tiempo dedicado y por compartir sus conocimientos para que la investigación salga a flote; de igual manera, mi profundo y sincero agradecimiento a nuestra Co-asesora Mirtha Roque, por aconsejarnos, orientarnos y compartir sus conocimientos. A los profesores Robert Almonacid y Nelson por sus consejos y recomendaciones en la parte experimental de la investigación.

John

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que estuvieron involucrados en el proceso de elaboración de esta tesis, desde la recolección de los frutos hasta el proceso final dentro del laboratorio.

A nuestra asesora, Dra. Delia Whu Whu por su motivación y apoyo en la culminación de esta tesis y a nuestra co-asesora Dra. Mirtha Roque Alcarraz por compartirnos sus conocimientos y sacar a flote el presente trabajo.

Niels

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue obtener etanol a partir del exudado de la pulpa de cacao utilizando fermentación alcohólica, para ello se aislaron una cepa del fruto de cacao y una cepa de la uva con lo cual se fermentaron las muestras de exudado y se comparó con la fermentación del exudado utilizando levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*). Se desarrollaron cuatro fermentaciones utilizando una cepa del fruto de cacao al 1 %, una cepa del fruto de cacao al 5 %, una cepa de la uva al 1 % y una cepa de *Saccharomices cerevisiae* al 1 %, y después estos fermentados se destilaron en las mismas condiciones.

Finalmente, se realizó la determinación del contenido de etanol de las muestras destiladas mediante cromatografía de Gases con detector de ionización de llama, encontrándose que las muestras tratadas con cepa de uva y *Saccharomyces cerevisiae* presentan mayor contenido de etanol comparadas con las muestras tratadas con cepa aislada del fruto de cacao, la cual fue identificada como *Kloeckera sp.*

Palabras clave: *Theobroma cacao L.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera spp*, fermentación alcohólica, etanol.

SUMMARY

The objective of this research work was to obtain ethanol from the exudate of the cocoa pulp using alcoholic fermentation. For this purpose, a strain of the cocoa fruit and a strain of the grape were isolated, with this samples of the exudate were fermented, and compared with the fermentation of the exudate using commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

Four fermentations were developed using a 1 % cocoa fruit strain, a 5 % cocoa fruit strain, a 1 % grape strain and a 1 % *Saccharomyces cerevisiae* strain, and then these fermented were distilled into the same conditions.

Finally, the determination of the ethanol content of the distilled samples was carried out by gas chromatography with flame ionization detector, finding that the samples treated with grape strain and *Saccharomyces cerevisiae* present higher ethanol content compared with the samples treated with isolated strain of the cacao fruit, which was identified as *Kloeckera sp.*

Key words: *Theobroma cacao L.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera spp.*, Alcoholic fermentation, ethanol.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos	2
1.3. Hipótesis.....	3
II. GENERALIDADES	
2.1. Aspectos botánicos.....	4
2.2. Aspectos químicos.....	14
2.3. Alcohol etílico o etanol	16
2.4. Métodos utilizados durante el proceso	21
III. PARTE EXPERIMENTAL	39
3.1. Materiales y equipos	39
3.2. Metodología	41
IV. RESULTADOS	61
4.1. Obtención del exudado de la pulpa de cacao.....	61
4.2. Estudio químico de exudado	65
4.3. Identificación de la cepa a utilizar en la fermentación	69
4.4. Fermentación del exudado.....	75
4.5. Cuantificación de azúcares reductores	83
4.6. Obtención de alcohol etílico	90
4.7. Determinación del contenido de etanol	90
V. DISCUSIÓN	94
VI. CONCLUSIONES	99
VII. RECOMENDACIONES	100
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
IX. ANEXOS	112

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: DIFERENCIAS DE LAS SUBESPECIES DEL <i>THEOBROMA CACAO</i> ²⁰ SEGÚN BOTÁNICA SISTEMÁTICA.....	10
TABLA N° 2: COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA PULPA DE CACAO	14
TABLA N° 3: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA Y SEMILLA DE CACAO ³²	15
TABLA N° 4: PRODUCCIÓN DE ETANOL A NIVEL MUNDIAL ⁴⁶ , DURANTE EL AÑO 2016. .	17
TABLA N° 5: METAS DE POLÍTICAS PLANTEADAS PARA BIOCOMBUSTIBLES ⁴⁷	18
TABLA N° 6: RELACIÓN DE PESOS DE FRUTOS ENTEROS Y PESOS DE PULPA CON SEMILLA DE CADA FRUTO.....	61
TABLA N° 7: RESUMEN DE LOS PESOS TOTALES Y CANTIDAD DE EXUDADO OBTENIDO DE 80 FRUTOS DE CACAO.....	65
TABLA N° 8: RESULTADO DEL ANÁLISIS PROXIMAL DEL EXUDADO DE LA PULPA DE CACAO.....	65
TABLA N° 9: RESULTADO DE LOS ENSAYOS CUALITATIVOS PARA IDENTIFICAR CARBOHIDRATOS	66
TABLA N° 10: LECTURA DE PH DE MUESTRAS INDIVIDUALES	68
TABLA N° 11 : LECTURA DE GRADOS BRIX DE MUESTRAS INDIVIDUALES.....	69
TABLA N° 12: CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	69
TABLA N° 13: CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.....	70
TABLA N° 14: DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE CO ₂	71
TABLA N° 15: MULTIPLICACIÓN DE COLONIAS EN AGAR CASEÍNPEPTONA ROJO DE FENOL	72
TABLA N° 16: CAMBIO DE COLORACIÓN DE COLONIAS EN AGAR CASEÍNPEPTONA ROJO DE FENOL.....	73
TABLA N° 17: ASIMILACIÓN DE COMPUESTOS DE CARBONO	74
TABLA N° 18: RESULTADOS EN UFC DEL RECUENTO EN PLACA	75
TABLA N° 19: RESULTADO DE UFC DE LA DILUCIÓN 10 ⁻⁴	76
TABLA N° 20: RELACIÓN ENTRE NÚMERO DE COLONIAS Y ABSORBANCIA DEL INÓCULO	76
TABLA N° 21: EVOLUCIÓN DEL PH Y GRADOS BRIX A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN CON CEPA NATIVA DEL FRUTO DE CACAO AL 1 %	78

TABLA N° 22: EVOLUCIÓN DEL PH Y GRADOS BRIX A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN CON CEPA NATIVA DEL FRUTO DE CACAO AL 5 %	79
TABLA N° 23: EVOLUCIÓN DEL PH Y GRADOS BRIX A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN CON CEPA NATIVA AISLADA DE LA UVA	80
TABLA N° 24: EVOLUCIÓN DEL PH Y GRADOS BRIX A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN CON CEPA DE LEVADURA COMERCIAL (<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>)	82
TABLA N° 25: RESULTADOS DE LECTURA DE LA ABSORBANCIA DE D-GLUCOSA CON DNS	83
TABLA N° 26: RESULTADOS DE LECTURA DEL MÉTODO DNS – <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i> AL 1 %.....	84
TABLA N° 27: RESULTADOS DE LECTURA DEL MÉTODO DNS – CEPA DE UVA AL 1 %	86
TABLA N° 28: RESULTADOS DE LECTURA DEL MÉTODO DNS – CEPA DE CACAO AL 1 %	87
TABLA N° 29: RESULTADOS DE LECTURA DEL MÉTODO DNS – CEPA DE CACAO AL 5 %	88
TABLA N° 30: CANTIDAD DE DESTILADO OBTENIDO DE LAS MUESTRAS FERMENTADAS	90
TABLA N° 31: PESOS CON PICNÓMETRO	90
TABLA N° 32: CONTENIDO DE ETANOL DE LAS MUESTRAS POR PICNOMETRÍA	92
TABLA N° 33: COMPARACIÓN DE RESULTADOS DEL CONTENIDO DE ETANOL OBTENIDO POR PICNOMETRÍA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: <i>THEOBROMA CACAO</i> L.....	4
FIGURA N° 2: DISTRIBUCIÓN DE <i>THEOBROMA CACAO</i> L. ⁹	8
FIGURA N° 3: CONVERSIÓN DE GLUCOSA POR DNS ⁴¹	28
FIGURA N° 4: SISTEMA CROMATOGRÁFICO GAS-LÍQUIDO ⁵¹	36
FIGURA N° 5: PROCESO DE OBTENCIÓN DEL EXUDADO DE LA PULPA DE CACAO	41
FIGURA N° 6: EQUIPO DE FERMENTACIÓN	54
FIGURA N° 7: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDARES	56
FIGURA N° 8: EQUIPO DE DESTILACIÓN SIMPLE	58
FIGURA N° 9: PLACA DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	67
FIGURA N° 10: GRÁFICO DE ABSORBANCIA Vs UFC- ENSAYO A.....	77
FIGURA N° 11: GRÁFICO DE ABSORBANCIA Vs UFC- ENSAYO B.....	77
FIGURA N° 12: CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DNS	84
FIGURA N° 13: CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Vs TIEMPO – <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> AL 1 %	85
FIGURA N° 14: CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Vs TIEMPO – CEPA DE UVA AL 1 %	87
FIGURA N° 15: CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Vs TIEMPO – CEPA DE CACAO AL 1 %.....	88
FIGURA N° 16: CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Vs TIEMPO – CEPA DE CACAO AL 5 %.....	89

I. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L. “cacao” es conocido mundialmente por ser la materia prima del chocolate, pertenece a la clase Magnoliopsida, orden Malvales, familia Malvaceae, género *Theobroma* y especie *Theobroma cacao*, siendo el principal fruto del género cultivado, debido al alto valor e importancia de sus semillas^{1,2}.

El cacao se origina en las regiones de selva tropical de América desde Perú hasta México, tiene aproximadamente el 80 % de su constitución en la corteza y el 20 % restante incluye semillas, pulpa y otros componentes. El principal uso del cacao es en la producción de chocolate. Otros productos, como los cosméticos también utilizan esta fruta como materia prima. En la industria del chocolate, el proceso comienza con la recolección de frutas, la extracción de pulpa y semillas, la fermentación (una serie de reacciones que conducen al desarrollo del sabor y aroma del chocolate), el secado y el tostado^{3,4}.

En la producción del cacao se aprovecha la semilla del fruto, la misma que representa cerca del 10 % del peso del fruto fresco, como consecuencia, durante los procesos industriales para explotar el cacao se generan desperdicios que por lo general no se utilizan. Entre estos desperdicios se encuentran las cáscaras, la pulpa que cubre la semilla la se elimina en gran parte cuando se realiza fermentación, debido a que acaba como “exudado” en los cajones de fermentación, no obstante, una fracción menor de esta pulpa se utiliza específicamente para generar el aroma del cacao⁵. Existe la

tendencia de emplear estos desperdicios como sustratos de fermentación y de esa manera obtener alcoholes, generando la oportunidad de desarrollar otras formas de energía renovable considerando el desarrollo sostenible con el ambiente^{5,6}.

El cultivo de cacao en el Perú es una fuente que genera importantes ingresos. Entre los principales lugares donde se produce cacao se encuentran Cajamarca, San Martín, Ucayali, Cusco, Huánuco, Ayacucho, Amazonas y Junín. En los últimos años la producción de cacao en el Perú se ha incrementado, llegando a triplicarse durante los 15 años previos según información brindada por el Ministerio de Agricultura y Riego⁷. En tal sentido, mediante el aprovechamiento de la pulpa del cacao se generará un mayor valor agregado al cultivo de cacao mejorando la situación socioeconómica de las familias de los agricultores.

A los efectos de utilizar como materia prima un subproducto de la producción del cacao para obtener etanol, se desarrolló el presente estudio.

1.1. Objetivo general

Obtener etanol por fermentación alcohólica a partir del exudado de la pulpa de cacao (*Theobroma cacao L.*)

1.2. Objetivos específicos

Realizar la caracterización química del exudado de la pulpa de cacao.

Aislar e identificar una cepa de levadura, a partir de frutos de cacao y uva, que posea capacidad de fermentación, para utilizarla en la fermentación del exudado de la pulpa de cacao.

Producir etanol a escala de laboratorio por fermentación.

Determinar el porcentaje de etanol obtenido en la fermentación del exudado de la pulpa del cacao (*Theobroma cacao L.*)

1.3. Hipótesis

Es viable obtener etanol por medio de fermentación alcohólica del exudado de la pulpa de cacao (*Theobroma cacao L.*)

II. GENERALIDADES

2.1. Aspectos botánicos

2.1.1. Clasificación taxonómica

La identificación y clasificación taxonómica se llevó a cabo en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Esta clasificación se realizó utilizando el Sistema de Clasificación de Cronquist de 1988.

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Orden : Malvales

Familia : Sterculiaceae

Género : *Theobroma*

Especie : *Theobroma cacao* L.

Nombres comunes: cacao, cocotero, kakaw, kokoe, cacaoboom



Figura N° 1: *Theobroma cacao* L.

(Fuente: Manual técnico del cultivo de cacao, IICA; 2017)

2.1.2. Descripción morfológica

Theobroma cacao L. Es un árbol que dura mucho tiempo y que puede alcanzar una altura de 5 a 8 metros y un diámetro de la corona de 4 a 6 metros. Sin embargo, puede alcanzar hasta 20 metros bajo condición del bosque, debido a la competencia por la luz con otras especies⁸.

El sistema de raíces del árbol consiste en una raíz giratoria y su longitud y forma varían según la estructura y textura de la consistencia del suelo. En suelos profundos con buena aireación puede tener un crecimiento de hasta 2 m de la raíz pivotante. Mientras las raíces secundarias son responsables de la nutrición de la planta, y el 70 % a 90 % de estos se encuentran en los primeros 30 cm del suelo⁸.

Con 2 años de envejecimiento presenta un tallo erecto y el crecimiento de la yema terminal se detiene con 1,0 a 1,5 m de altura. Después, aparecen las primeras coronas, compuestas de 3 a 5 ramas principales. En los primeros años, el árbol del cacao presenta tallos lisos de corteza. Posteriormente, debido al desarrollo de las flores, se vuelve áspera y robusta. Las hojas son oblongas, acuminadas y glabras, tienen un color que va del verde (más o menos rosado) al violeta, dependiendo de la cantidad de antocianina. Cuando las hojas son longevas pierden su pigmentación, volviéndose verde pálido y, finalmente, verde oscuro y rígido. Las flores de cacao aparecen en cojines florales en el tronco o ramas leñosas, a partir de brotes que se desarrollan en hojas viejas. Las flores son hermafroditas y tienen la siguiente constitución: cinco sépalos, cinco pétalos, cinco estaminodios, cinco estambres y un pistilo cuyo ovario tiene cinco óvulos. Las flores de cacao tienen características

estructurales, esto limita su polinización exclusivamente por insectos. Los principales agentes polinizadores del cacao son un pequeño grupo de insectos perteneciente a la familia Ceratopogonidae, género Forcipomya. En la región amazónica, el árbol del cacao tiene dos flores. Una que coincide con el comienzo del período menos lluvioso y uno principal que se produce al final de la estación seca y el comienzo de la temporada de lluvias. Anualmente, un árbol de cacao en estado adulto puede llegar a producir más de 100 000 flores; sin embargo, solo un 0,1 % se llega a convertir en fruta. Las flores descolgadas caen dentro de las 48 horas. Por otro lado, los polinizados y las flores fertilizadas permanecen fijas en el pedúnculo y desarrollan el fruto⁸. El fruto presenta un pericarpio carnoso compuesto por tres partes distintas:

- El epicarpio, que es carnoso y grueso, cuya región epidérmica externo puede estar pigmentado.
- El mesocarpio, que es delgado y duro, pero no muy lignificado
- El endocarpio, el cual es carnoso y no muy grueso.

Por lo general, la fruta cuando es inmadura es verde y amarilla cuando está madura. Otros son Púrpura (vino tinto) en la fase de desarrollo y naranja en el período de maduración (período entre la polinización y la fruta). La maduración varía de 140 a 205 días, con un promedio de 167 días. Por lo general, para obtener 1 kg de cacao comercial se requiere un aproximado de 15 a 31 frutas. La forma de la semilla varía de elipsoide a ovoide con 2 a 3 cm de longitud. Está cubierto por pulpa mucilaginoso blanca la cual tiene un sabor ácido-dulce. El embrión posee cotiledones con colores que van del blanco al violeta. Las semillas de cacao tienden a ser bastante sensibles cuando existen

cambios de temperatura, por lo que mueren en poco tiempo al sufrir deshidratación⁸.

2.1.3. Hábitat y distribución geográfica

El cacao tiene su origen en América Central, México y el norte de Sudamérica (Perú, Venezuela, Brasil, Ecuador, Colombia, Surinam, Guyana y Guayana Francesa)^{9,10}.

Inicialmente el *Theobroma cacao* L. tenía un área de distribución que se extendía desde el Amazonas hasta la zona sur de México; sin embargo, desde que llegaron personas provenientes de Europa a América, éstos introdujeron el cacao en África, el Caribe y Asia, y se considera a la fecha como pantropical. Los países de Indonesia, Costa de Marfil y Ghana son considerados como los países que realizan la mayor producción de cacao¹¹.

En su hábitat natural, el cacao crece en el subsuelo de la selva tropical. A menudo crece en grupos a lo largo de las orillas de los ríos, donde las raíces pueden ser inundadas durante largos períodos del año. El cacao crece en elevaciones bajas, generalmente a menos de 300 msnm, en áreas que presentan precipitaciones entre 1,000 y 3,000 mm por año⁹.

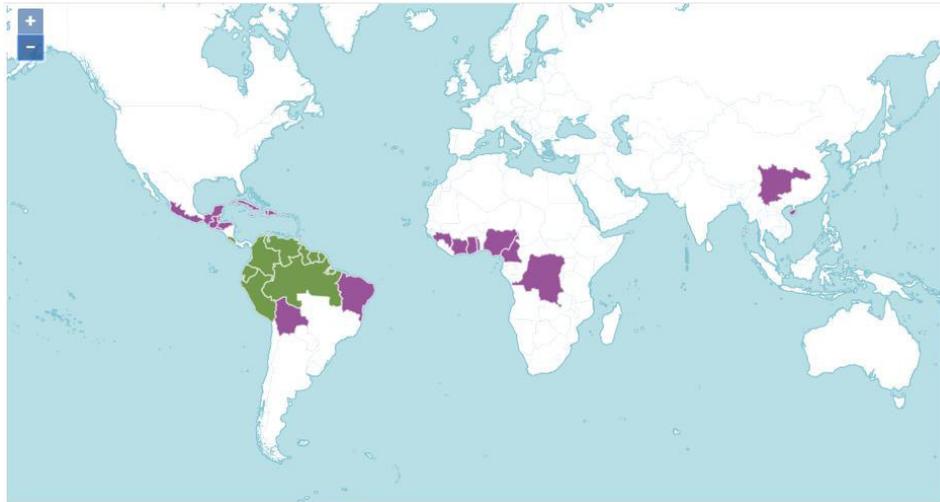


Figura N° 2: Distribución de *Theobroma cacao* L.
 *Coloración verde (Nativo), coloración violeta (introducido)
 (Fuente: Plants of the World online, 2018).

2.1.4. Variedades de cacao

Para la especie *Theobroma cacao* L. se han encontrado varias clasificaciones respecto a sus variedades; sin embargo, la más reconocida es la propuesta Urquhart en el año 1961, la cual es una clasificación que va a simplificar a esta especie en tres variedades como son: Cacao Forastero, Trinitario y Criollo¹².

Cacao criollo

Los Españoles al ingresar a México lo denominaron como cacao genuino y se presume que ha sido cultivado inicialmente por los Mayas hace aproximadamente 3000 años atrás, a esta variedad se le conoce por ser de alta calidad y además de tener bajas cantidades de tanino; estos árboles demoran en crecer y no son tan vigorosos por lo que tienden a enfermarse y son fácilmente atacados por insectos; además, tienen la característica de ser morfológicamente diversos, cuyas mazorcas por lo general son de forma

alargada y con punta acentuada, sus frutos tienen pigmentos de color rojo y una esculturada y delgada cubierta. Esta variedad de cacao necesita para completar su fermentación alrededor de dos a tres días; además, debido a que es bastante aromático se le utiliza para elaborar los más finos chocolates. Se estima que esta variedad de cacao representa entre el 5 al 10 % de la producción mundial. A la fecha esta variedad es cultivada en países de América como Honduras, Venezuela, Perú, Guatemala, Ecuador, Colombia, México, Bolivia, Trinidad, Nicaragua y Granada¹³⁻¹⁷.

Cacao trinitario

Esta variedad es cultivada en los países como Trinidad, Venezuela, Colombia, y México; sin embargo, también se está introduciendo en el resto de países que producen cacao. Este cacao es una variedad híbrida entre el cacao Forastero cultivado en la Guyanas y el cacao Criollo cultivado en Venezuela, y precisamente es su característica híbrida lo que le da una elevada heterogeneidad variable. Es de origen reciente, al inicio se le clasificaba como cacao Forastero y a la fecha se le puede reproducir de manera artificial. La variedad Trinitario representa entre el 10 y 15 % de la producción de cacao a nivel mundial^{18,19}.

Cacao forastero

Tiene su origen en la Amazonía, la forma de su fruto es corta y ovalada, cuya superficie presenta una textura lisa, cuando maduran obtienen una pigmentación amarilla o verde. Presenta un mesocarpio muy lignificado por lo que al momento de cortar es muy complicado debido a su espeso Pericarpio; el color de sus granos es oscuro o púrpura, son de pequeño tamaño y de

forma aplastada. El chocolate que se produce con sus granos tiene un sabor amargo debido a su alto contenido de taninos en su composición. Es por esto que se le considera un cacao “corriente”. Las zonas donde se cultivan son África Occidental, el Caribe, América Central y Brasil y a la fecha su producción representa alrededor del 80 % de la producción de cacao a nivel mundial, por lo que se le considera la más importante variedad en cuanto a comercialización^{14, 16, 19}.

Por otro lado, en la literatura taxonómica de la botánica sistemática se clasifica al *Theobroma cacao* en dos subespecies.

Theobroma cacao L. subsp. *sphaerocarpum* (Chev.) Cuatrec.

Theobroma cacao L. subsp. *Cacao*.

Dentro de esta clasificación la subespecie *sphaerocarpum* pertenece a la variedad Forastero, mientras que la subespecie *cacao* corresponde a la variedad Criollo¹¹.

Tabla N° 1: Diferencias de las subespecies del *Theobroma cacao*²⁰ según botánica sistemática (Fuente: Cuatrecasas, 1964)

Órgano	<i>T. cacao</i> subsp. <i>cacao</i>	<i>T. cacao</i> subsp. <i>sphaerocarpum</i>
Forma del fruto	Alargado, claviforme, fusiforme o anguloso-ovado, atenuado hacia la base y apicalmente apiculado.	Elíptico, casi esférico o más o menos cuadrangular, redondeado en ambos extremos.
Superficie del fruto	Más o menos con 10 costillas marcadas o con 5 costillas y rugosa.	10-surcada y lisa o ligeramente rugosa.
Pericarpo y mesocarpo	Pericarpo moderadamente grueso, mesocarpo leñoso delgado.	Pericarpo muy delgado, mesocarpo leñoso grueso.
Semillas	Ovadas o elípticas, normalmente redondas en vista transversal.	Ovadas, más o menos comprimidas.
Cotiledones	Amarillos o blanco-amarillentos.	Púrpuras o violeta oscuros.

2.1.5. Producción y demanda

Durante el periodo que comprenden los años 2014 y 2015 la producción a nivel mundial del grano de cacao fue de 4,236 millones de toneladas. En Costa de Marfil la producción de cacao alcanzó 1,796 millones de toneladas lo cual fue superior en comparación con la anterior temporada. En Ghana la producción fue de 740,000 toneladas, existiendo una disminución de 157,000 toneladas en comparación con la anterior temporada; por otro lado, en América la producción alcanzó 763,000 toneladas por lo que tuvo un aumento de 36,000 toneladas en comparación con la anterior temporada, Asia y Oceanía presentó una disminución en su producción de aproximadamente 11 %, alcanzando 400,000 toneladas, por lo que junto con Indonesia representan los lugares en los que se presentó una mayor disminución. En este mismo periodo se considera que la producción de cacao en África representa el 73 % de la producción a nivel mundial. La producción en América representa el 18 %, mientras que en Asia y Oceanía el 10 %²¹.

2.1.6. Distribución y producción en el Perú

En el Perú, se considera a ocho departamentos donde se realiza el cultivo de *Theobroma cacao*, entre lo que se encuentran San Martín, Cajamarca, Piura, Cuzco, Madre de Dios, Huánuco, Loreto y Junín; esto debido a que su crecimiento varía entre los 0-500 metros de altitud y posiblemente hasta los 1000 metros; sin embargo, existen otros departamentos que también tienen el hábitat adecuado para su cultivo, como por ejemplo Ucayali, Ayacucho y Pasco. Las condiciones climatológicas son importantes para el crecimiento de

cacao, la fluctuación es alrededor de los 24 °C y nunca exceda de 30 °C, con una precipitación por encima de los 1200 mm ^{22,23}.

Existe una variedad de cacao conocida como “porcelana” la cual tiene las semillas de color blanco y se cultiva en el norte del Perú, esta variedad tiene una uniformidad fenotípica muy marcada en el color de su mazorca, su sabor a malta o panela, la forma de arquitectura que tiene el árbol, y su susceptibilidad a ser atacado por hongos produciéndose una pudrición parda y la enfermedad moniliasis²⁴. Se presume que tiene origen en la variedad criolla de Cajamarca debido a que existe similitud en la morfología de sus semillas y frutos y además que a la fecha se cultiva en Huancabamba y Morropón del departamento de Piura las cuales son zonas vecinas a San Ignacio de Cajamarca²⁵. En el V Concurso Nacional de Cacao lo cual fue realizado en el departamento de Lima en el año 2011, esta variedad de cacao blanco ocupó el primer puesto, destacando por su agradable sabor, toque floral, atractivo color y acidez frutal ²⁶.

Durante el periodo comprendido entre el año 2012 y 2013 en el Perú se produjo 78 000 toneladas de grano de cacao los cuales fueron cultivados en los departamentos de Cajamarca, Amazonas, Junín, San Martín, Ucayali, Cusco, Huánuco y Ayacucho; Sin embargo, también tuvieron participación los departamentos de Pasco, Loreto y Madre de Dios. De lo producido en ese periodo, lo cultivado en San Martín representa el 37 % y lo cultivado en Cusco el 18 % ²³.

Por otro lado, durante la inauguración de la VIII edición del Salón del Cacao y Chocolate realizado en Lima, el Director General Agrícola del Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), Ángel Manero Campos, indicó que el Perú se

convertirá en el primer exportador mundial en el año 2021 de cacao orgánico²⁷.

2.1.7. Crecimiento

Una vez sembradas las semillas tarda entre tres o cuatro días para que aparezcan las primeras raíces pivotantes las cuales son de color blanquecinas, estas raíces en los próximos 15 a 20 días llegan a tener una profundidad de aproximadamente 10 a 15 cm. Al principio la plantita no ramificada alcanza una altura de 1 a 2 m. El tallo formado es pequeño y es ramificado en verticilos que tienen 3 a 5 ramas. Los ejes van creciendo de forma horizontal o vertical. Cuando las plantas ya son juveniles, los ejes que crecieron en forma vertical se originan en cualquier parte del principal eje. Por lo general, estos ejes se desarrollan en la parte inferior de la primera horqueta. Cuando las plantas ya son adultas desarrollan en ocasiones nuevos ejes verticales. Estas plantas se desarrollan por completo después de 10 años de sembrar la semilla. Los frutos de estas plantas empiezan a evidenciarse transcurridos los 3 a 4 años después de la siembra. La máxima cosecha se puede lograr pasados los 6 a 7 años después de su siembra. Las plantas cultivadas en desfavorables condiciones de luz llegan a medir 4 a 8 m; sin embargo, en suelos cercanos a los ríos y con buenas condiciones de luz alcanzan hasta los 20 m de altura. Sus hojas son formadas en 4 a 5 fases y su fotosíntesis aparece después de su despliegue foliar en aproximadamente 4 a 5 meses, y después de transcurrido un promedio de 1 año empiezan a caer. El sistema radicular es pivotante lo cual puede llegar a tener una profundidad entre 120 a 200 cm ^{14, 16,29}.

2.2. Aspectos químicos

2.2.1. Pulpa de cacao

Los frutos de la planta de cacao son conocidos como "mazorcas" los cuales están formados por una cáscara la cual contiene en la parte interior granos o almendras que están rodeados de una pulpa de color blanquecina y sabor dulce y ácido, la cual retiene la capacidad de retener agua que va a ser útil para evitar la deshidratación y favorecer la germinación. La pulpa crece de los tegumentos de las semillas y se le caracteriza por ser muy aromática y tener un agradable sabor, está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, y en su composición contiene elevada cantidad de azúcares las cuales son muy variables; sin embargo, sus constituyentes más destacados son la arabinosa, el ácido galacturónico, la xilosa y la glucosa. Esta pulpa en pequeña cantidad beneficia al grano durante su fermentación generando un agradable aroma y sabor, asimismo, con el exudado de esta pulpa se pueden fabricar vinagres, nata, mermeladas, alcohol, etc ^{5,28}.

Tabla N° 2: Composición fisicoquímica de la pulpa de cacao

Características	Unidades	Valores		Referencia
pH	-	3,19	3,45	30
Acidez valorable	% de ácido cítrico	1,57	2,12	30
Sólidos solubles	°Brix	12,97	16,55	30
Vitamina C	mg 100 g ⁻¹	3,30	7,60	31
Proteína	g 100 g ⁻¹	0,73	1,13	31
Lípidos	g 100 g ⁻¹	0,12	0,65	31

Contenido de agua	g 100 g ⁻¹	75,33	80,06	31
Fibra	g 100 g ⁻¹	0,29	0,35	31
Almidón	g 100 g ⁻¹	3,65	4,58	31
Sucrosa	g 100 g ⁻¹	6,62	8,22	31
Glucosa	g 100 g ⁻¹	3,72	5,29	31
Fructosa	g 100 g ⁻¹	4,41	5,95	31

Tabla N° 3: Composición química de la pulpa y semilla de cacao³².

Componente	100 gr de Pulpa	100 gr de semilla
Lípidos	0,3 g	17,1 g
Proteína	2,8 g	19,0 g
Carbohidratos	16,5 g	47,8 g
Energía	71,0 cal	404,0 cal
Fibra	1,1 g	6,9 g
Agua	79,2 g	8,7 g
Ceniza	1,2 g	7,4 g
Fósforo	41,0 mg	801,0 mg
Hierro	0,7 mg	10,5 mg
Calcio	6,0 mg	200,0 mg
Niacina	3,20 mg	2,50 mg
Riboflavina	0,15 mg	0,20 mg
Vitamina C	21,00 mg	18,90 mg

Tiamina	1,8 mg	0,02 mg
Vitamina A (retinol)	32,0 mg	--

(Fuente: Brack, 1999)

2.3. Alcohol etílico o etanol

El alcohol etílico en condiciones normales es un líquido volátil, inflamable, transparente e incoloro. Su olor es agradable, familiar y característico como es su sabor cuando es adecuadamente diluido con agua. De lo contrario su sabor puede ser picante.

Las propiedades físicas y químicas del alcohol etílico dependen principalmente del grupo hidroxilo. Este grupo imparte polaridad a la molécula y también da lugar a enlaces de hidrógeno. Estas dos propiedades explican el comportamiento físico anormal de los alcoholes de menor peso molecular en comparación con los hidrocarburos de peso equivalente. Los estudios espectrográficos infrarrojos han demostrado que, en el estado líquido, los enlaces de hidrógeno son formados debido a la atracción entre el hidrógeno que corresponde al hidroxilo de una determinada molécula y el oxígeno del hidroxilo de una segunda molécula. El efecto neto de esta unión es hacer que el alcohol líquido se comporte como si estuviera en gran parte dimerizado. Este comportamiento es análogo al comportamiento del agua, que sin embargo está más fuertemente unido y parece existir en grupos líquidos de más de dos moléculas. La asociación del alcohol etílico, se debe notar, se limita al estado líquido en estado vapor, este alcohol es monotérmico.

La asociación molecular de alcohol etílico líquido da lugar a un punto de ebullición anormalmente alto y un alto calor de vaporización. La constante de Trouton para el alcohol etílico es de 26,9 en comparación con 21 para los líquidos no asociados. Esta constante es la entropía de vaporización a presión atmosférica y se obtiene dividiendo el calor molecular de vaporización por la temperatura absoluta del punto de ebullición atmosférico. La polaridad y la asociación del alcohol etílico también se manifiestan en el comportamiento no ideal de muchas soluciones de alcohol etílico y en el hecho de que el alcohol etílico forma un gran número de azeótropos. Muchos otros ejemplos de anomalías del alcohol etílico pueden encontrarse en las propiedades de las soluciones de alcohol etílico que aparecen en la literatura³⁴.

2.3.1. Situación del alcohol a nivel mundial

En un estudio realizado a finales del 2016, se encontró que Estados Unidos tuvo una producción anual de 15 330 millones de galones de bioetanol y Brasil tuvo una producción anual de 7 295 millones de galones, siendo ambos los países con mayor producción de bioetanol; por otro lado, a la Unión Europea se le consideró como la más importante fuente de producción de biodiesel⁴⁶.

Tabla N° 4: Producción de etanol a nivel mundial ⁴⁶, en el año 2016.

Región	Millones de galones
Estados Unidos	15330
Brasil	7295
Unión Europea	1377
China	845

Canadá	436
Tailandia	322
Argentina	264
India	225
Resto del Mundo	490
Total	26584

(Fuente: Zola y Barranzuela, 2017)

Según lo que figura en la Tabla N° 5, se puede observar que ciertos países desarrollan metas a nivel político con el propósito de incrementar su producción de biocombustibles. Tal es el caso de Perú, que desde el año 2006 se ha propuesto aumentar de forma progresiva la producción de biodiesel y bioetanol, por lo que se puede observar que existe una tendencia favorable para desarrollar proyectos nuevos orientados a producir biocombustibles.

Tabla N° 5: Metas políticas propuestas para biocombustibles⁴⁷.

Región	País	Bioetanol	Biodiesel
América del Norte	USA	Renewable Fuels Standard & Alternative Fuels Standard: Al 2012: 28,000 millones de litros de combustibles renovables Al 2017: 132,000 millones de litros de combustibles renovables y alternativos	

	Canadá	Al 2010: 5 %	Al 2012: 2 % de contenido renovable en diésel y gasolina
Europa	Unión Europea	Al 2010: 5,75 % Al 2015: 8 % Al 2020: 10 % para biocombustibles en sustitución de diésel y gasolina para transporte	
Asia	Japón	Al 2010: Sustitución de 500 000 m ³ de gasolinas para transporte por año (1,8 millones de litros al año de bioetanol en el corto plazo). Al 2030: 6 millones de m ³ de bioetanol producido a nivel local que representa el 10 % de la demanda actual de gasolinas.	
	China	Al 2020: 15 % del consumo utilizado para transporte	
	India	Al 2020: 15 % del consumo utilizado para transporte	
Oceanía	Australia	Al 2010: 350 millones de litros de bioetanol y biodiesel.	
Latinoamérica y el Caribe	Argentina	Al 2010: 5 % sobre el producto final.	Al 2010: 5 % sobre el producto final.
	Bolivia	-	A partir del 2007: 2,5 % hasta llegar a un 20 % en el 2015.
	Brasil	Al 2001: 22 %	A partir del 2008: 2 % Al 2013: 5 % Al 2020: 20 %

	Colombia	A partir del 2006: 10 % por regiones.	A partir del 2008: 5 %
	Paraguay	Mínimo de 18 %	Al 2007: 1 % Al 2008: 3 % Al 2009: 5 %
	Perú	A partir del 2006: 7,8 % en forma progresiva por regiones.	A partir del 2008: 5 % en forma progresiva por regiones.

(Fuente: Pistonesi et al., 2008)

Comercialmente se vienen produciendo biocombustibles generados a partir de biomasa no alimentaria, debido a la existencia de tecnología avanzada, problemas económicos y la necesidad de actuar sobre el cambio climático. Nuevos procesos mejorados en la industria han sido cruciales para que se reduzcan los costos favoreciendo la expansión del mercado. Es por ello que Estados Unidos presenta la mayor cantidad de establecimientos para la producción de biocombustibles, además de tener la capacidad instalada para producir alcohol celulósico, después lo siguen países como la República Popular China, Canadá, la Unión Europea y Brasil, respectivamente. Existen diferencias en cuanto a los alcances tecnológicos y materias primas que estos países utilizan para combustibles, tal es el caso de Estados Unidos que utiliza maíz como materia prima para producir biocombustible, y Brasil a partir de la caña de azúcar, esta última es muy eficiente para convertir el agua, el dióxido de carbono y la luz solar en energía almacenada⁴⁸.

El maíz produce siete veces menos de energía en comparación con la caña de azúcar en la producción de etanol ⁴⁶.

En los últimos diez años debido a una inversión realizada para este rubro de US\$ 200 millones ha traído como consecuencia la generación de 40 000 hectáreas sembradas y la generación de 15 000 puestos de trabajo en el Perú. Por otro lado, de acuerdo a un estudio de investigación realizado por la Universidad de Cartagena en el 2015, en donde se midió la eficiencia que tienen los países de Latinoamérica para producir biocombustibles dio como resultado que Brasil y Perú son iguales de eficientes en la producción de bioetanol y biodiesel, comparado con el resto de países que mostraron poseer eficiencia baja o media⁴⁹.

Empresas representativas del Perú en la producción de biocombustibles

Considerando la gran cantidad de campos de cultivo de caña de azúcar que posee el Perú comparado con los demás países de Latinoamérica tiene la posibilidad de convertirse en exportador principal de bioetanol. Las empresas Maple Energy y Caña Brava son dos de las más grandes empresas del sector dedicada a la producción de biocombustibles.

2.4. Métodos utilizados durante el proceso

2.4.1. Fermentación

Existen diferentes tipos de fermentación; sin embargo, para efectos de obtener alcohol a partir del exudado de la pupa de cacao se utiliza la fermentación alcohólica.

Durante el proceso de obtención de almendras de cacao para la industria del chocolate en las fincas, una porción de la pulpa que rodea a las almendras es removida. Esta porción es conocida en la industria como “exudados”. La porción no removida, que permanece adherida a las semillas es utilizada para el proceso natural de fermentación e intervienen en el desarrollo de los precursores del aroma del chocolate. A pesar de que la pulpa es necesaria para el proceso de fermentación de las almendras de cacao, en la mayor parte de los casos existe más de la necesaria, siendo posible eliminar más del 50 % sin afectar la fermentación. Este exceso de pulpa ha sido utilizado como materia prima en la fabricación de productos alimenticios en países como Costa Rica y Brasil debido al delicioso sabor tropical que posee. Entre los productos desarrollados a partir de la pulpa de cacao extraída se pueden mencionar algunas bebidas fermentadas, jaleas, jugo de cacao, mermeladas, néctar de cacao, malteada de cacao y vinagre de miel de cacao, entre otros^{5,33}.

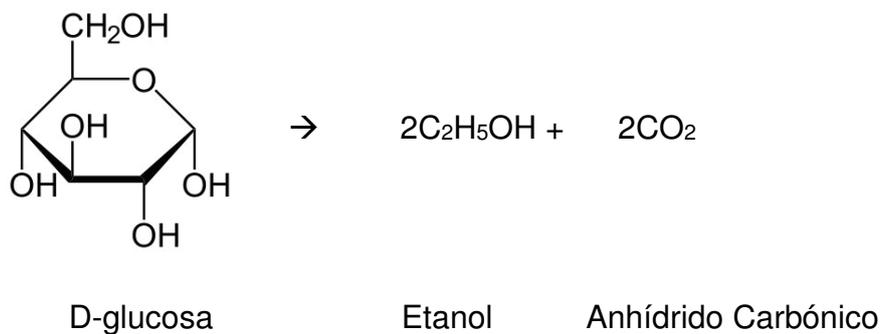
2.4.1.1. Fermentación alcohólica

La fermentación en términos generales hace referencia a la degradación aeróbica o anaeróbica de un substrato orgánico, producto de la cual se generan diversas sustancias, por la acción de algunas bacterias y levaduras. Estos microorganismos realizan la fermentación gracias a las enzimas que ellos mismos producen para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP³⁵.

La fermentación anaeróbica es posiblemente la más antigua, puesto que los organismos vivos aparecieron en una tierra primitiva carente de oxígeno.

Existen diferentes tipos de fermentación, teniendo en cuenta el tipo de organismo que la produce, el substrato, o incluso las condiciones impuestas tales como pH o el abastecimiento de oxígeno³⁵.

La fermentación alcohólica es una de las más importantes y mejor conocidas. Esta es una biorreacción en la que el azúcar se transforma en alcohol y dióxido de carbono y es representada mediante la ecuación de Gay-Lussac³⁵.



Las levaduras son las principales responsables de esta degradación. Dentro de ellas la *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura utilizada con mayor frecuencia en los procesos fermentativos. Existen otras levaduras así como algunas bacterias dentro de ellas la *Zymomona mobilis* que según diversos estudios generan alcohol a través de la fermentación; pero su explotación a nivel industrial es mínima³⁶.

Desde el punto de vista estequiométrico esta reacción parece ser sencilla; pero la secuencia de reacciones desarrolladas para transformar la glucosa hasta dos moléculas de etanol y dos de anhídrido carbónico es un proceso complejo, ya que al mismo tiempo de realizar la fermentación la levadura utiliza la glucosa y otros nutrientes adicionales para reproducirse³⁶.

2.4.1.1.1. Limitantes de la Fermentación alcohólica

El rendimiento de los procesos de fermentación es influenciado por algunas condiciones como:

Concentración de alcohol

Las levaduras se ven afectadas por las elevadas concentraciones de alcohol que son producidas durante la fermentación debido a que el etanol inhibe el transporte celular de algunas sustancias como la D-xilosa, el amonio, la glicina y algunos aminoácidos, las que intervienen en el proceso de metabolismo de estos microorganismos; por otra parte, el contenido elevado de alcohol afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que, las concentraciones elevadas de etanol inducen la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el que influye de forma negativa en la reacción y puede detener la transformación de la glucosa a glucosa-6 fosfato. La capacidad de tolerancia a las concentraciones de alcohol depende de la habilidad de la célula de levadura para transportar el etanol del interior de la célula al medio externo, este proceso depende de dos características básicas de la célula como son la fluidez y composición de la membrana. Tomando en cuenta lo antes mencionado, los microorganismos logran tolerar las elevadas concentraciones de etanol cuando la célula modifica la composición de los ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol. El segundo método de adaptación al etanol se produce cuando la levadura modifica la composición lipídica de la membrana debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácido grasos de cadena larga. En conclusión las

levaduras pueden resistir a las altas concentraciones de alcohol y vivir en estos medios al realizar algunas modificaciones en su estructura celular y esto ocurre por ejemplo a través del aumento del contenido de ácidos grasos insaturados en relación a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos³⁷.

pH- acidez del sustrato

El pH es un factor que limita en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras son afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan sea este alcalino o ácido. Las levaduras tienen un pH óptimo de trabajo entre 4 y 5, en este rango de valores el pH es suficientemente bajo como para inhibir el desarrollo de muchos tipos de bacterias. El pH óptimo para *Saccharomyces cerevisiae* está entre 4,2 y 4,8; estos valores de pH tienden a disminuir debido a la producción de ácidos, formados durante el metabolismo de las levaduras al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. Sin embargo, si el pH se eleva a la región alcalina, cambia el curso de la fermentación y se produce glicerol y ácido acético, además de alcohol y dióxido de carbono. Es por ello que en los procesos desarrollados a nivel industrial, se utilizan soluciones Buffer con el objetivo de mantener niveles adecuados de acidez³⁸.

Por otro lado, según varias investigaciones el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras durante el desarrollo de una fermentación alcohólica oscila en el rango de 3 y 5; siendo el pH 4 el que produce mayor concentración de etanol en un menor tiempo⁶⁹.

Concentración de azúcares

Las concentraciones altas de azúcares es otra de las condiciones que afectan en los procesos de ósmosis dentro de la membrana celular, el rango adecuado de concentración de azúcar que debe tener un substrato para la fermentación es de 10 a 18 %, ya que a concentraciones de 22 % a más las levaduras empiezan a tener problemas en el proceso de respiración celular³⁸.

Temperatura

Una levadura es un microorganismo mesófilo, por lo tanto, su temperatura no puede sobrepasar los 50°C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte. Debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C³⁹.

Ritmo de crecimiento de las Cepas

Durante el proceso de fermentación las células de levaduras crecen en número gracias a las condiciones favorables que se puedan desarrollar en el medio; es decir que dependiendo de las condiciones favorables se incrementa la concentración de levaduras³⁹.

Materias primas

En los procesos de fermentación el etanol puede obtenerse a partir de la transformación de cualquier azúcar o polisacáridos debiéndose realizar un tratamiento previo para algunas materias primas antes de iniciar el proceso de fermentación debido a la capacidad de fermentación que poseen las levaduras

con respecto a los carbohidratos. En general la materia prima que provee de azúcares fermentables puede clasificarse en tres grupos³⁵:

Fuentes con alto contenido de azúcares.

Dentro de estas, encontramos al azúcar de caña, melazas, remolacha, y jugos de fruta. Estas materias primas presentan un elevado contenido de azúcares simples y fermentables, como glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa, entre otros. Las fuentes de este tipo tienen como ventaja el no necesitar tratamientos previos para obtener los azúcares fermentables, ya que estos se encuentran presentes y disponibles.

Fuentes con alto contenido de almidón.

Como lo son el maíz, la malta, la cebada, la avena, el trigo, el arroz, el sorgo y otros. Este tipo de fuentes requieren un tratamiento previo con la finalidad de obtener azúcares fermentables. Los cereales, por ejemplo, necesitan ser tratados previamente en un proceso de hidrólisis para romper el biopolímero almidón en carbohidratos fermentables y de esta forma puedan estar disponibles para los procesos metabólicos de los microorganismos que realizarán la fermentación alcohólica.

Fuentes ricas en celulosa.

Como ejemplo de este tipo de fuentes tenemos a la madera, algunos residuos de pasta y el papel. Las materias primas dentro de este grupo presentan elevado contenido de celulosa y son las fuentes más abundantes de biomasa a nivel mundial, y su uso ha tenido un creciente interés global; sin embargo, debido a la compleja composición química que poseen estas fuentes ricas en

celulosa se han producido retos tecnológicos que aún no han podido ser satisfactoriamente superados³⁶.

2.4.2. Método de DNS (ácido 3,5 Dinitrosalicílico) para la cuantificación de azúcares reductores.

En 1921, Sumner introdujo el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para analizar los azúcares reductores en orina normal y diabética. El reactivo DNS reacciona con azúcares reductores y otras moléculas reductoras para formar ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, compuesto aromático que absorbe fuertemente la luz a 540 nm, este compuesto es susceptible de ser medido a través de una técnica espectrofotométrica cuantitativa para determinar la cantidad de azúcar reductor presente ⁴⁰.

La solución reactivo de DNS (ácido 3,5 Dinitrosalicílico) posee una coloración amarilla al ser preparada, luego de la reacción de óxido reducción adquiere una coloración de rojiza a naranja⁴¹. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración del azúcar reductor en la muestra. La coloración formada puede ser determinada al medir las absorbancias en un espectrofotómetro, además de seguir las leyes de Lambert-Beer⁴².

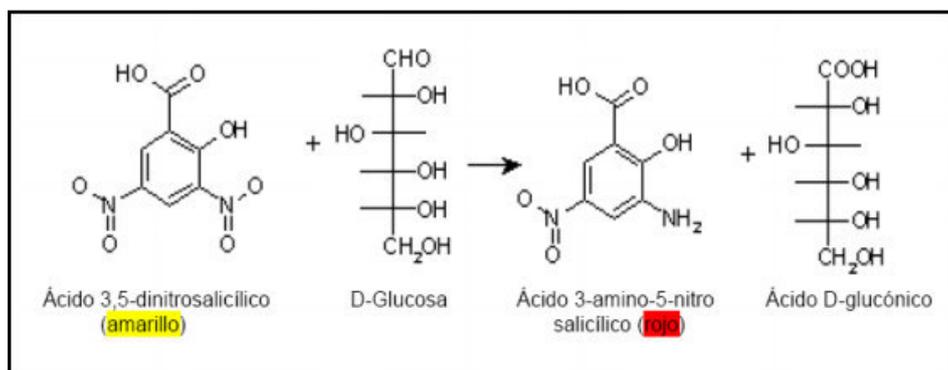


Figura N° 3: Reacción de glucosa con DNS.

(Fuente: Delgado, 2009)

El método de DNS ha sufrido múltiples modificaciones a través del tiempo, lo que le han permitido adecuarse al análisis de distintos tipos de muestras. La principal ventaja de este método radica en la alta sensibilidad y productividad ya que es un método de tipo espectrofotométrico. Este método presenta dos variantes según la forma de preparación de la solución reactivo, una preparación en caliente y otra en frío. Según bibliografía la preparación en frío demuestra menores o comparables desviaciones con respecto al método de Eynon y Lane (método referencial en la Industria sucro-alcoholera) además de ser más productiva; por otro lado es más recomendable que la preparación en caliente pues demuestra menores desviaciones⁴³.

2.4.3. Espectrofotometría UV-VIS

La espectrofotometría está conformada por un grupo de técnicas que hacen uso de la luz para medir las concentraciones químicas de ciertas sustancias en determinadas muestras.

La luz presenta un doble comportamiento: como partícula y como onda. El comportamiento como partícula explica que la luz (energía) es absorbida o emitida en paquetes de energía llamadas fotones al interactuar con los cuerpos. El comportamiento como onda explica la forma cómo se desplaza a través del espacio, y asocia este comportamiento a una frecuencia (ν) y a una longitud de onda (λ). Es por ello que la luz se puede explicar como un conjunto de radiaciones que se desplazan a través de todo el espacio y que aquellas radiaciones que el ojo humano sea capaz de detectar corresponden a la pequeña porción de espectro de radiaciones conocidas como la luz visible.

Los físicos han establecido la cantidad de energía que transporta un determinado fotón y que está asociado a la constante de Planck ($h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$) y a la velocidad de la luz ($3 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}$) de la siguiente manera:

$$E (\text{energía asociada a un fotón}) = \frac{h \times c}{\lambda} = h \times \nu$$

El conjunto de radiaciones electromagnéticas conocidas se encuentra detallado en el espectro electromagnético, siendo el espectro electromagnético que corresponde a la luz visible aquel que comprende las emisiones de energía con longitudes de onda entre 380 nm y 780 nm.

Una molécula aumenta de energía cuando absorbe un fotón, durante este proceso la molécula pasa de su estado fundamental al estado excitado y viceversa al perder un fotón. La ganancia de energía (fotón) generada por una radiación en el espectro visible sobre una muestra que contenga moléculas produce el movimiento de los electrones de orbitales de menor a mayor energía⁴³.

La absorción de las radiaciones que corresponden a la zona ultravioleta y visible del espectro se ha utilizado de forma amplia para el análisis cuantitativo. Las mediciones se realizan basándose en la ley de Lambert-Beer, la que establece una ecuación que ha sido utilizada por la Química Analítica muy a menudo por lo cual es considerada una de las ecuaciones más utilizadas en esta rama Química⁴⁴.

2.4.3.1. Ley de Lambert-Beer

La ley de Lambert-Beer establece que existe una relación directamente proporcional entre la absorbancia con la longitud del trayecto que viaja la luz

al atravesar el medio de absorción y la concentración de la especie absorbente.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

En donde:

A: Absorbancia

B: Distancia que atraviesa la luz por el cuerpo

c. Concentración de la especie absorbente.

ε : Coeficiente de absortividad molar

Esta ley resulta válida para cada longitud de onda del haz de luz incidente en la muestra, siempre y cuando no existan interferencia con otros compuestos. La absorbancia de un compuesto a cada longitud de onda es directamente proporcional a la concentración del soluto, siempre y cuando la fuente de luz sea constante⁴⁵.

La ley Lambert-Beer presenta algunas limitantes para el adecuado empleo de la ecuación descrita:

Requiere de radiaciones monocromáticas.

Otra limitación se debe a la radiación parásita (aquella que está fuera del ancho de banda efectiva del selector y se debe a procesos de reflexión y dispersión de la radiación que se producen en distintas partes del instrumento de medida)

Finalmente las limitaciones químicas de esta ley se producen cuando las especies absorbentes participan en una reacción de equilibrio. Las

más comunes que originan este efecto son la complejación metálica con más de un tipo de complejo, los ácido-base y la disociación disolvente-analito.

Para realizar el análisis cuantitativo utilizando la ley Lambert-Beer, es necesario realizar la preparación de una curva patrón o también llamada curva de calibración ya que dicha curva permite establecer relaciones entre el valor de la concentración que posea el analito en una solución y su absorbancia⁴⁴.

2.4.3.2. El espectrofotómetro UV - visible

Un espectrofotómetro es un aparato diseñado para medir los factores de reflectancia y transmitancia espectrales. Su objetivo es comparar el flujo radiante transmitido o reflejado con el incidente de cada longitud de onda. Toda sustancia tiene la capacidad de absorber la energía radiante, incluso el vidrio que parece ser completamente transparente, absorbe ligeramente en longitudes de onda que corresponden al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en el infrarrojo. Este aparato tiene la capacidad de filtrar un haz de radiación electromagnética (REM), separándolo para facilitar la identificación, calificación y cuantificación de la energía. Los parámetros de eficiencia, resolución, sensibilidad y rango espectral dependerán del diseño y de la selección de los componentes ópticos que lo conforman ⁵².

Los componentes que constituyen un espectrofotómetro son los siguientes:

Fuente de radiación (fuente de luz)

Selector de longitud de onda (Monocromador)

Recipiente de la muestra (cubetas para muestras)

Detector

Amplificador de la señal

Dispositivos de lectura (ordenador)

2.4.4. Destilación simple

Es un método que permite separar líquidos gracias a las diferencias en la temperatura de ebullición que presentan. Para realizar el proceso de destilación se aplica calor a una mezcla de líquidos hasta llegar a la temperatura de ebullición de uno de los líquidos componentes, e inmediatamente el componente separado en forma de vapor se condensa y se recolectan como un líquido destilado ⁵⁵.

El método de destilación simple se utiliza para separar líquidos con punto de ebullición inferior a 150 °C a presión atmosférica, ya sea de impurezas no volátiles o de otros líquidos miscibles que posean una diferencia de al menos 25°C en el punto de ebullición con respecto al líquido de interés⁵⁶.

El alambique ha sido el aparato utilizado para realizar la destilación en el laboratorio durante mucho tiempo. El alambique consta de un recipiente que almacena la mezcla a la que se aplica calor a partir de una fuente externa, una porción que funciona como condensador o refrigerante donde los vapores generados se enfrían al entrar en contacto con una superficie un poco más fría, es decir que induce la condensación del líquido vaporizado al estado líquido y una tercera y última porción formada por un recipiente que almacena el líquido condensado. Hoy en día a escala de laboratorio se pueden armar

sistemas destiladores a base de materiales de vidrio como balones, refrigerantes, termómetros y pequeñas conexiones para evitar la pérdida de la porción vaporizada. En la industria química la destilación es utilizada en la separación de mezclas simples o complejas ⁵⁶.

2.4.5. Picnometría

Este método permite calcular la densidad de cualquier líquido. Para ejecutar este cálculo, el método requiere la determinación de tres masas: masa del picnómetro vacío, masa del picnómetro con agua y la masa del picnómetro con la muestra problema teniendo en cuenta que las mediciones se realizan a una determinada temperatura. Para realizar las mediciones es necesario contar con una balanza analítica en un ambiente en el cual no influyan vibraciones externas y que dicha balanza se encuentre ubicada sobre una superficie que permita la estabilidad del instrumento. Se trata de un método simple, pero que requiere de la comprensión de sus fundamentos. Además, requiere de cierta destreza y cuidados por parte del analista para obtener resultados fiables. Del mismo modo, en cualquier determinación de la densidad de una sustancia líquida es importante tener en cuenta que el volumen varía con la variación de la temperatura, por lo que la densidad también sigue este patrón de variación⁶¹.

Para poder calcular el contenido de etanol es necesario comparar las densidades con las tablas de Windisch (tablas referenciales que relacionan % de alcohol y la densidad del mismo a una temperatura determinada)

2.4.6. Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica de separación que utiliza una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en la columna cromatográfica para separar componentes vaporizados según la afinidad de estos por la fase estacionaria. Al realizar la separación cromatográfica de gases, la muestra es vaporizada antes de ser inyectada en la columna cromatográfica. Luego de la inyección de la muestra se produce la elución de los componentes volatilizables por el calor de una fuente de energía a través de la columna de acero impulsada por el flujo de un gas inerte que hace el papel de fase móvil. Este tipo de cromatografía se diferencia de las otras en que la fase móvil y las moléculas del analito no van a interactuar; sino que solo va a servir como transportador del analito a través de la columna. La cromatografía de gases permite separar, identificar y cuantificar los componentes de la muestra analizada. Para el análisis cuantitativo se debe realizar la medición de parámetros como por ejemplo, los volúmenes de retención y los tiempos, así como de medidas de alturas o áreas de picos presentes en el cromatograma, dichas alturas están relacionadas con la concentración del analito en la muestra objeto de estudio. En este método cromatográfico la columna así como su diseño constituyen el corazón de la separación. En cromatografía de gases los analitos siempre se encuentran en estado gaseoso y se distribuyen entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria que puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido; y según el tipo de fase estacionaria utilizada, sea sólida o líquida. La cromatografía de gases se puede clasificar en: cromatografía gas-sólido (CGS) y cromatografía gas-

líquido (CGL), siendo la más selectiva y la que mayores usos presta la cromatografía gas-líquido (GCL) ⁵¹.

Durante la cromatografía gas-líquido ocurre que el analito va a dividirse entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria que está inmovilizada sobre las paredes de un tubo capilar o en la superficie de un relleno solido inerte. En la figura número 4, podemos observar un esquema general de un sistema cromatográfico gas-líquido. Martin y Synge enunciaron por primera vez el concepto de gas líquido, quienes también perfeccionaron la cromatografía de distribución liquido-liquido. A pesar de todo esto, tuvo que pasar más de diez años antes de que la cromatografía gas-liquido adquiriera la importancia que hoy se le reconoce y se empezara a utilizar en forma rutinaria como herramienta de laboratorio. En 1955 se comercializó por primera vez un cromatógrafo de gases para el desarrollo de la cromatografía de tipo gas-liquido. Desde entonces las aplicaciones de los equipos cromatógrafos de gases han crecido enormemente ⁵¹.

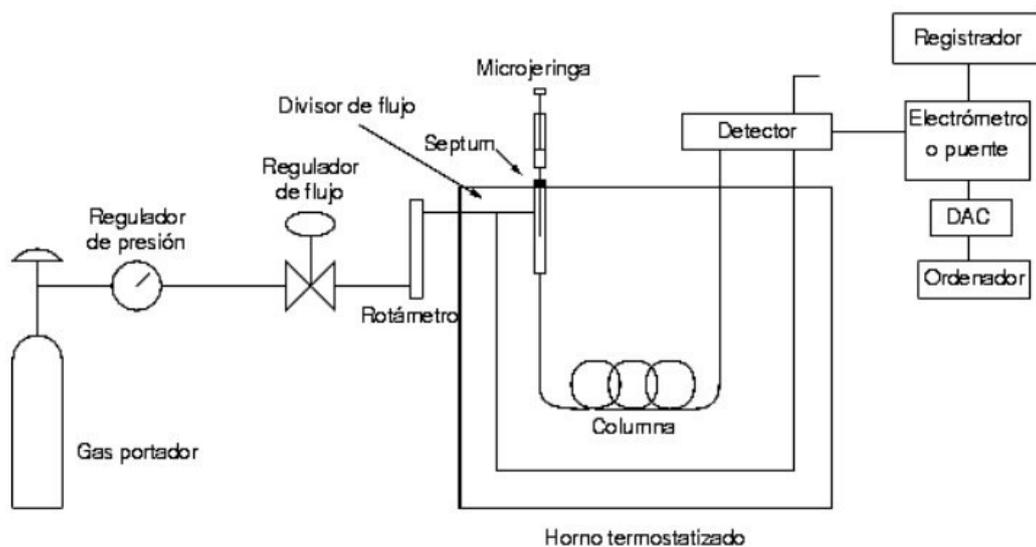


Figura N° 4: Sistema cromatográfico gas-líquido.

(Fuente: Rincón y Duque, 2014)

Para el desarrollo del análisis de una sustancia por cromatografía de gases se requieren diferentes tipos de detectores, uno de los más conocidos y comunes es el detector de ionización en la llama el cual será utilizado en el presente trabajo para determinar el contenido de etanol.

2.4.6.1. Detector de Ionización de Llama (FID)

Este detector es el más utilizado y el más versátil que existe. Técnicamente es un quemador de oxígeno/hidrógeno, en donde se va a realizar la mezcla del hidrógeno con el efluente de la columna conformado por el gas portador y el analito. Inmediatamente, esta mezcla de gases es encendida gracias a una chispa eléctrica, y se produce una llama con una alta temperatura. La mayor parte de los compuestos orgánicos al ser sometidos a altas temperaturas se pirolizan y producen electrones y iones, que funcionan como conductores eléctricos ⁵¹.

La generación de electrones y iones es aprovechada para establecer una diferencia de potencial de unos centenares de voltios formada entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector ubicado por encima de la llama. La corriente que se genera en este punto es baja de alrededor de los 10 a 12 A, por lo que debe ser obligatoriamente amplificada con el uso de un amplificador de alta impedancia. El proceso de ionización que se produce en la llama es sumamente complejo, pero el número de iones producidos se aproximan al número de átomos de carbono transformados en la llama. Esta aproximación permite que sea un detector sensible a la cantidad de masa del analito o dicho de otra forma que sea sensible al número de átomos de

carbono que salen de la columna, por lo que no le afectan las variaciones en el flujo de salida de esta mezcla de gases ⁵¹.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y equipos

Material vegetal

Frutos de Cacao (*Theobroma cacao L.*)

Material de Laboratorio

Frascos de vidrio 250 mL

Probetas 100 mL

Pipetas 5 mL y 10 mL

Tips de 100 μ L y 1000 μ L

Micropipetas (Eppendorf)

Tubos de centrifuga de plástico de 10 mL

Placas Petri de plástico

Reactivos

Ácido 3,5 dinitrosalicílico

BaCl₂

Cepas

Cepa nativa aislada del fruto de cacao

Cepa aislada de la uva; obtenida a partir de un mosto de uva trabajado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Cepa de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), proporcionada por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Medios de cultivo

Agar Sabouraud

Agar caseína-peptona rojo fenol

Azúcares

Lactosa

D-xilosa

Sacarosa

Maltosa

D - Fructosa

D - Galactosa

D - Glucosa

Equipos de Laboratorio

Balanza analítica (Sartorius CPA224S)

Bioreactor

Autoclave (Chincan LDZX-50KBS)

Estufa

Horno

Potenciómetro

Refrigeradora

Equipo de destilación simple

Picnómetro

Refractómetro

3.2. Metodología

3.2.1. Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental.

3.2.2. Obtención de los frutos de cacao

Los frutos fueron obtenidos en el caserío Santa Lucía del departamento de San Martín, el cual se encuentra a 503 msnm.

La cosecha se realizó 02 días antes de su procesamiento, para ello se consideraron los siguientes parámetros: Madurez caracterizada por un color rojizo-amarillo y la apariencia física la cual debe estar sin golpes y sin enfermedades.

3.2.3. Obtención del exudado de la pulpa de cacao

El proceso seguido para obtener el exudado de la pulpa de cacao se detalla en:

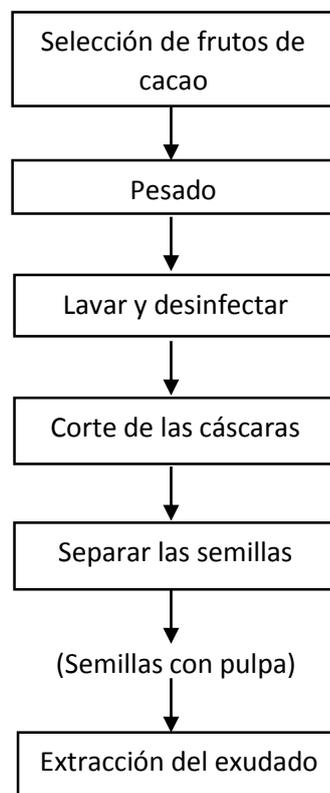


Figura N° 5: Proceso de obtención del exudado de la pulpa de cacao

3.2.3.1. Descripción del proceso

Selección de los frutos

Una vez obtenidos los frutos, en el laboratorio se seleccionaron aquellos que se encontraban en buenas condiciones, separando los frutos que presentaban cortes inadecuados y cambio de coloración en su aspecto debido a maltrato o contaminación por plagas.

Pesaje

Se realizó el pesaje de los frutos enteros, el pesaje de las semillas con pulpa y placenta y el pesaje de solo las cáscaras.

Lavado y desinfección

Para evitar la contaminación de la pulpa, antes de realizar el corte del fruto se realizó la desinfección de la mesa de trabajo utilizando Hipoclorito de sodio al 0,5 % y los frutos fueron lavados con jabón y agua potable.

Corte

Para realizar el corte se utilizó guantes quirúrgicos y un cuchillo de acero inoxidable lavado con jabón y agua potable para evitar que contamine la pulpa.

El corte fue de tipo Longitudinal.

Separación de las semillas cubiertas de pulpa

Considerando no contaminar la muestra, para extraer las semillas cubiertas con la pulpa se utilizó una cuchara de acero inoxidable, previamente lavada con jabón y agua potable; las semillas se depositaron en un envase lavado para su pesaje.

Extracción del exudado de la pulpa de cacao

La extracción de la pulpa de cacao se realizó mediante el método por presión descrito por Luzuriaga⁵³.

Se tomaron las semillas con pulpa extraídas de cuatro frutos y se depositaron en un colador que iba sobrepuesto en un envase, sobre las semillas se colocó otro colador que sirvió como depósito de las cáscaras del fruto que ejercerían presión.

El peso de las cáscaras que ejercían presión fue igual al peso de las semillas cubiertas con pulpa.

Después de 30 horas se separó el exudado de la pulpa de cacao, que ha caído por presión, en frascos estériles, y luego se mantuvieron en refrigeración.

3.2.4. Estudio químico del exudado

3.2.4.1. Análisis proximal del exudado

Se determinó el contenido de carbohidratos, grasas, proteínas, cenizas, fibra, humedad según metodologías AOAC. Este análisis es importante para establecer las condiciones de la matriz de fermentación.

Para realizar el estudio químico del exudado de la pulpa de cacao se envió una muestra al Centro de Control Analítico – CCA (CENPROFARMA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, donde se realizaron las pruebas de determinación de proteínas, humedad, cenizas, grasas, fibras, carbohidratos y energía, mediante métodos AOAC.

3.2.4.2. Ensayos cualitativos para identificación de carbohidratos⁶²

a) **Ensayo con Reactivo de Molish:** Ensayo general para cualquier carbohidrato sin importar su complejidad. El ácido sulfúrico hidroliza los carbohidratos complejos y deshidrata los monosacáridos formando furfural y derivados; finalmente, se forman compuestos de color violeta por reacción con el α -naftol.

Procedimiento: En un tubo de ensayo se agregó 2 mL del exudado, enseguida se adicionó V gotas del Reactivo de Molish y se agitó. En seguida, se inclinó el tubo y se agregó con cuidado por las paredes 2 mL de solución concentrada de ácido sulfúrico.

Interpretación: Si se forma un anillo de color violeta en la parte de la interfase indica la existencia de azúcares en el exudado.

b) **Ensayo con Reactivo de Lugol:** Se fundamenta en el hecho de que se forma un complejo entre el ión I_3^- y la amilosa que es una molécula presente en el almidón; la cual presenta en su estructura una conformación helicoidal. La reacción ocurre cuando el I_3^- ingresa a la hélice y forma como consecuencia un producto de condensación que va a tener un color negruzco o azul según sea la concentración del almidón en la muestra.

Procedimiento: Se tomó un tubo de ensayo y se añadió 2 mL del exudado. Se acidificó la muestra con V gotas de ácido clorhídrico 1 M. Después de mezclar se adicionó I gota de lugol y luego se agitó.

Interpretación: La formación de un color azul o negro indicó la presencia de almidón en el exudado.

c) Ensayo con Reactivo de Barfoed: Ensayo para diferenciar monosacáridos de disacáridos reductores. El reactivo de Barfoed presenta Cu^{+2} el cual va a ser reducido a Cu^{+} en 2 minutos si reacciona con un monosacárido, lo cual se evidencia al formarse un color rojo. Por otro lado, si la reducción y la formación del color rojo tarda de 7 a 12 minutos, entonces el reactivo a reaccionado con disacáridos.

Procedimiento: En un tubo de ensayo se agregó 5 mL de Reactivo de Barfoed, luego se añadió 1 mL del exudado. Se calentó el tubo en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos. Se sacó el tubo y dejó reposar por 3 minutos.

Interpretación: La formación de un color rojo en el tubo indicó la presencia de azúcares.

d) Ensayo con Reactivo de Bial: Este ensayo se fundamenta en una reacción específica que identifica pentosas y algunos ácidos urónicos los que son descompuestos al ser calentados con ácidos fuertes. Bajo condiciones controladas de temperatura, tiempo y concentración de HCl, las pentosas son rápidamente transformadas a furfural, mientras que las hexosas presentes en la muestra son convertidas en hidroximetilfurfural. En presencia del ion férrico (Fe^{+3}) y orcinol (5-metil resorcinol), el furfural se condensa rápidamente y produce un complejo de color verde al calentar. El reactivo de Bial tiene dos componentes el HCL y el orcinol.

Procedimiento: Se colocó 5 mL del Reactivo de Bial en un tubo de ensayo. Luego se adicionó 2 mL del exudado, se mezcló y calentó suavemente la solución hasta que las primeras burbujas alcanzaran la superficie.

Interpretación: La formación de un color verde en el tubo indicó la presencia de pentosas.

e) Ensayo con Reactivo de Selliwanoff (resorcinol, HCl concentrado y agua destilada): El ensayo con el reactivo de Selliwanof permite identificar la presencia de cetosas en la muestra de carbohidratos. El proceso de la reacción ocurre de la siguiente manera: en presencia de una solución concentrada de HCl, las cetosas son deshidratadas más rápidamente que las aldosas produciendo derivados del furfural. Estos compuestos derivados de furfural forman complejos con el resorcitol presente en el reactivo de Selliwanoff, y posteriormente la solución se torna de un color rojo cereza.

Procedimiento: En un tubo de ensayo se agregó 2 mL de reactivo de Selliwanoff, después se añadió 0,5 mL del exudado y se mezcló. En seguida, se introdujo el tubo en un baño maría a 100 °C por 1 minuto.

Interpretación: La formación de un color rojo cereza indicó la presencia de azúcares.

3.2.4.3. Identificación de carbohidratos por cromatografía en capa fina⁶³

Fase móvil: Agua: Cloroformo: Ácido acético (0,5: 3: 3,5)

Revelador: Se realizó el pesaje de 1 g de difenilamina y luego se disolvió junto con 1 mL de anilina en 100 mL de acetona. La mezcla fue trabajada con ácido fosfórico 85 % antes de utilizar (10: 1 v/v, respectivamente)

En la placa cromatográfica se aplicó la muestra de exudado y los estándares de glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa.

Adicionalmente, se realizaron los ensayos de determinación de pH y Grados Brix del exudado debido a su implicancia dentro de la fermentación.

3.2.4.4. Determinación de pH

En 10 tubos de centrifuga de plástico de 15 mL se agregó 10 mL de muestra de exudado a cada uno y se realizó la lectura de pH utilizando un potenciómetro; finalmente, se calculó el promedio de las 10 lecturas.

3.2.4.5. Determinación de grados Brix

Este procedimiento se realizó utilizando los 10 tubos con muestras de exudado utilizados en la lectura del pH.

En primer lugar se lavó el prisma del refractómetro con agua destilada y se secó con ayuda de papel toalla. Se realizó la lectura de grados Brix de una gota de agua destilada la cual debe dar como resultado 0 grados Brix, posteriormente se secó el prisma y la placa de luz diurna y se agregó en el prisma una gota de la muestra de exudado contenida en el primer tubo y se realizó la lectura de grados Brix. Se repitió el mismo procedimiento para la lectura de las muestras restantes y finalmente se determinó el promedio de las 10 lecturas.

3.2.5. Aislamiento de la cepa nativa

3.2.5.1. Cepa nativa del fruto de cacao

Se obtuvo la cepa a partir del fruto. El procedimiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la siguiente manera:

Se lavó la parte externa del fruto con una solución estéril.

Se sembró la solución de lavado en Agar Sabouraud dextrosa suplementado con Cloranfenicol al 0,005 % (p/v) y se incubó a 30 °C durante tres días.

Luego de tres días se observó las colonias y se hizo repiques en placas Petri con Agar Sabouraud Dextrosa de aquellas colonias cuyas características en aspecto y color eran semejantes a levaduras del género *Saccharomyces*.

Se siguió con los repiques hasta aislar las colonias.

3.2.5.2. Cepa nativa de uva

El proceso de aislamiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología y se desarrolló de la siguiente manera:

Se seleccionó las uvas maduras y en buenas condiciones, separándolas de las podridas y en descomposición. Se estrujó y realizó la fermentación de estas uvas de manera espontánea dentro de un recipiente estéril a 25 °C por dos semanas⁶⁴.

Se realizó muestreos a los mostos al término de sus dos semanas de fermentación en placas Petri con Agar Sabouraud Dextrosa

suplementado con Cloranfenicol al 0,005 % (p/v), posteriormente fueron incubadas a 30 °C durante tres días.

Luego de los tres días se hizo repiques en placas Petri con Agar Sabouraud Dextrosa de aquellas colonias cuyas características en aspecto y color eran semejantes a levaduras del género *Saccharomyces*.

Se siguió con los repiques hasta aislar colonias.

3.2.6. Identificación de las cepas a utilizar en la fermentación.

Para identificar las cepas se realizaron las siguientes pruebas:

3.2.6.1. Pruebas de identificación microbiológica:

Caracterización macroscópica

En placas Petri con agar Sabouraud Dextrosa suplementado con Cloranfenicol al 0,005 % (p/v), se realizó el sembrado de las tres cepas y se incubó por un periodo de 5 a 7 días a 30 °C después del cual se pudo observar sus características morfológicas.

Caracterización microscópica

En la caracterización microscópica se observaron las células de levaduras luego de la fijación y tinción de las mismas con azul metileno en placas portaobjetos. Las células fueron observadas en microscopio con aceite de inmersión a 100X; luego se observó las células formadas y se registró sus características.

3.2.6.2. Caracterización bioquímica de la levadura.

Producción de CO₂

Esta se realizó con el empleo de monosacáridos y disacáridos disueltos en medios líquidos y semisólidos para observar la capacidad fermentativa de la cepa aislada frente a los azúcares. Las muestras se incubaron a 30 °C durante una semana. Los resultados se evaluaron como positivos al haber producción de burbujas de CO₂ o cambio de coloración en el medio.

Fermentación en agar caseínpeptona rojo fenol (Multiplicación de colonias y cambio de coloración)

Se preparó el agar según indicación en etiqueta y luego se agregó 9 mL del preparado en 24 tubos de ensayo limpios y secos, luego se añadió 1 ml de solución saturada de los azúcares al 5 % en 21 tubos, de tal modo que existían tres tubos para cada uno de los 7 azúcares, y los tres tubos restantes se utilizaron como blanco; y finalmente, se esterilizaron en el autoclave.

Una vez esterilizados, se dejó enfriar los tubos y posteriormente se realizó el sembrado por punción de las colonias de la cepa aislada del fruto de cacao, cepa de uva y cepa de levadura comercial (*saccharomyces cerevisiae*), de tal modo que cada cepa fue sembrada por triplicado en cada azúcar y una en el blanco. Posteriormente se incubó por un periodo de 3 a 7 días a 30 °C.

Luego de incubar se observó si existía multiplicación de colonias y cambio de coloración.

3.2.6.3. Prueba de asimilación de compuestos de carbono (Método Auxonográfico) ⁶⁵⁻⁶⁷.

Preparación de las placas:

El inóculo fue preparado a partir de un cultivo fresco de la levadura que se desea identificar en agar Sabouraud. Se inoculó 4 mL de solución salina estéril con colonias aisladas para obtener una suspensión que sea equivalente a la escala 4 de McFarland.

Luego se mezcló 36 mL de medio Sabouraud fundido y enfriado a 45 °C con los 4 mL del inóculo anterior. Se homogenizó la mezcla, evitando la formación de burbujas.

El contenido se vertió en una placa de Petri estéril (se realizó este paso rápidamente con el fin de evitar la muerte de las levaduras debido a la temperatura y la solidificación prematura del medio).

El medio se dejó solidificar durante 30 min y luego se comprobó que la superficie del agar esté bien seca; posteriormente, se realizó pozas en el agar con ayuda de un sacabocado estéril y frío.

Se prepararon soluciones saturadas de cada carbohidrato a testar utilizando agua como disolvente y luego se procedió a esterilizarlas para finalmente agregarlas por filtración en las pozas realizadas en el agar.

Incubación:

Las placas fueron incubadas en una estufa a 30 °C y examinadas a las 48 horas de incubación.

Interpretación de los resultados

La utilización de los hidratos de carbono se pone de manifiesto por el crecimiento de la levadura alrededor del disco correspondiente.

3.2.7. Fermentación del exudado

Utilizando un equipo fermentador se realizaron cuatro fermentaciones del exudado; en la primera fermentación se utilizó cepa nativa del fruto de cacao a una concentración del 1 %, en la segunda fermentación se utilizó la cepa nativa del fruto de cacao al 5 %, en la tercera se hizo uso de la cepa aislada de la uva al 1 %, y finalmente, la cuarta fermentación se realizó utilizando una cepa de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) al 1 %.

El desarrollo de la fermentación en cuanto a parámetros de control (temperatura, análisis de azúcares reductores, control del pH, velocidad de agitación) se realizó siguiendo una metodología similar a la establecida por Garzón y Hernández³⁵.

3.2.7.1. Determinación de la concentración del inóculo

Según la metodología de Garzón y Hernández³⁵ el inóculo adecuado a utilizarse en un proceso de fermentación es aquel que genera conteos aproximados de 10^6 a 10^8 UFC/L cuando se realizan siembras del microorganismo en placas Petri con un agar que permita el crecimiento del microorganismo. Para desarrollar la metodología antes mencionada se realizaron diluciones, en solución salina estéril, de colonias aisladas que presentaban un diámetro de más o menos 3 mm. Estas colonias se obtuvieron en siembras por agotamiento en placas Petri con agar Sabouraud Dextrosa suplementado con Cloranfenicol al 0,005 % (p/v), posteriormente se realizaron los conteos teniendo en cuenta las placas Petri que permitían realizar un conteo de microorganismos entre 30 y 300 UFC y

finalmente se determinó cuántas colonias de 3 mm de diámetro deben ser utilizadas para la preparación del inóculo. Adicionalmente, con el fin de establecer una relación entre la absorbancia del inóculo y las UFC que deben generar según la metodología de Garzón y Hernández se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro.

3.2.7.2. Equipo de fermentación

El equipo de fermentación constaba de un envase de vidrio de 1,5 L el cual estaba contenido en otro envase de vidrio, formando un espacio entre ellos por donde circuló el líquido que se encontraba en un baño maría controlado para mantener el agua a 30 °C; para realizar este proceso, el baño maría contenía un controlador de temperatura y un motor que hizo posible que el líquido circulara a través del equipo mediante el uso de dos mangueras.

El envase interno de 1,5 L, donde se agregó la muestra, presentó una tapa de acero que contiene en la mitad de la parte interna un agitador y en la parte externa un motor que estaba conectado con un dispositivo que nos permitió controlar la velocidad de agitación de la muestra.

Asimismo, en la tapa se encontraban dos orificios, a través de uno de ellos se extrajeron las muestras haciendo uso de una pipeta y a través del otro orificio se recogió el CO₂ producido, para ello se hizo uso de una especie de manguera delgada de plástico estéril, el cual se obtuvo de una extensión de venoclisis, y se conectó con un recipiente que contenía una solución de BaCl₂ saturada. Los orificios se mantuvieron cerrados durante la fermentación mediante una cinta estéril para evitar la contaminación y mantener las condiciones de anaerobiosis.

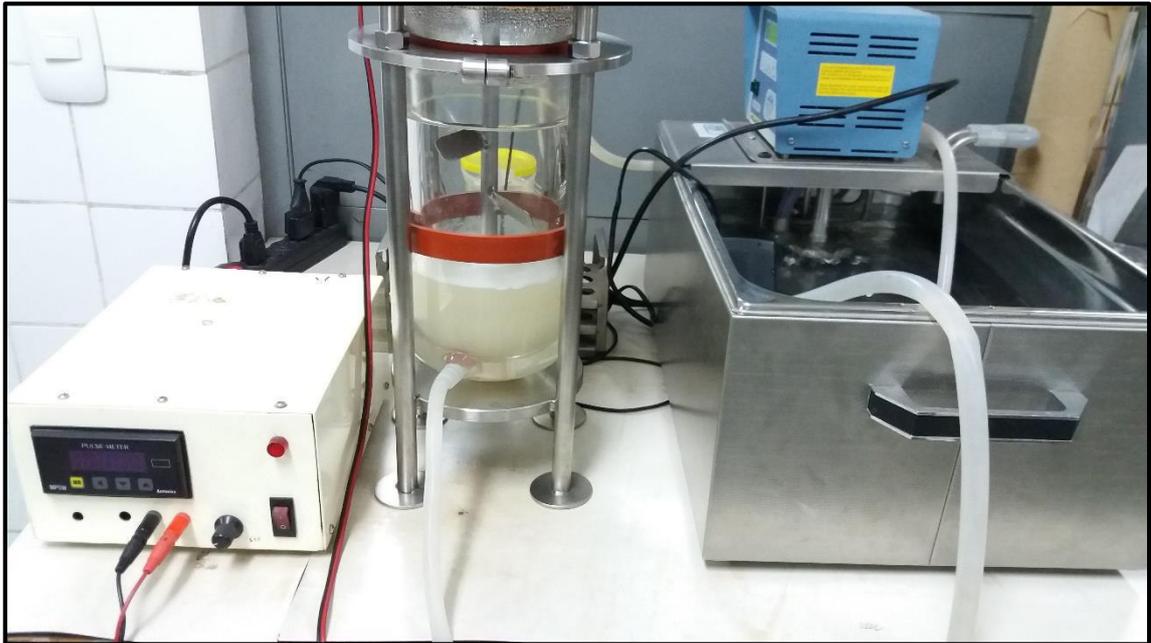


Figura N° 6: Equipo de fermentación

3.2.7.3. Proceso de fermentación

Se tomó 500 mL de la muestra de exudado y se agregó al envase de 1,5 L, luego se añadió el inóculo de la cepa. Se prendió el baño maría y se programó para que se mantenga a 30 °C que es la temperatura adecuada en la que la cepa de levadura ejerce su función fermentadora, asimismo, se tomó una primera muestra para determinar los grados Brix y el pH con el que el exudado inició la fermentación.

Se prendió el dispositivo que permitía realizar la agitación de la muestra a una velocidad de 115 RPM. Posteriormente, se tomó las muestras cada 3 horas durante 12 horas y luego cada 2 horas hasta las 30 horas y finalmente cada hora hasta que las lecturas de pH y grados Brix nos indiquen que la muestra del exudado se ha fermentado.

3.2.8. Cuantificación de azúcares reductores

3.2.8.1. Preparación del reactivo DNS (ácido 3,5 Dinitrosalicílico)⁶⁸.

La preparación del reactivo ha sufrido variaciones a través del tiempo y dependerá de la matriz a la que se le aplique.

Se pesó 0,8 g de NaOH, 15 g de tartrato de Na-K y 0,5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico en beakers separados. Luego se disolvió el NaOH en 20 mL de agua destilada con ayuda de una bagueta y se añadió el tartrato de Na-K agitando lentamente hasta disolución; después se agregó agua destilada hasta 40 mL del beacker y luego se comenzó a incorporar de forma lenta el ácido 3,5 dinitrosalicílico y se agitó con la varilla hasta completa disolución; finalmente, se agregó agua destilada hasta completar 50 mL. El beacker fue forrado con papel aluminio a fin de evitar la exposición prolongada a la luz.

3.2.8.2. Preparación de la curva de calibración

Para la preparación de la curva patrón se prepararon soluciones estándares a partir de glucosa y posteriormente se generó la curva con las lecturas a 540 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV-VIS.

3.2.8.3. Preparación de la solución madre

Se pesó 500 mg de glucosa en una fiola de 50 mL, luego se disolvió en agua destilada y enrasó con el mismo disolvente (Se obtuvo una concentración de 10 mg/mL).

3.2.8.4. Preparación de las soluciones estándares

De la solución madre preparada se generó 06 diluciones estándares de concentraciones que iban de 0,3 mg/mL hasta 0,9 mg/mL tal como describe el

siguiente esquema. Las diluciones fueron preparadas con pipetas volumétricas y enrasadas con agua destilada.

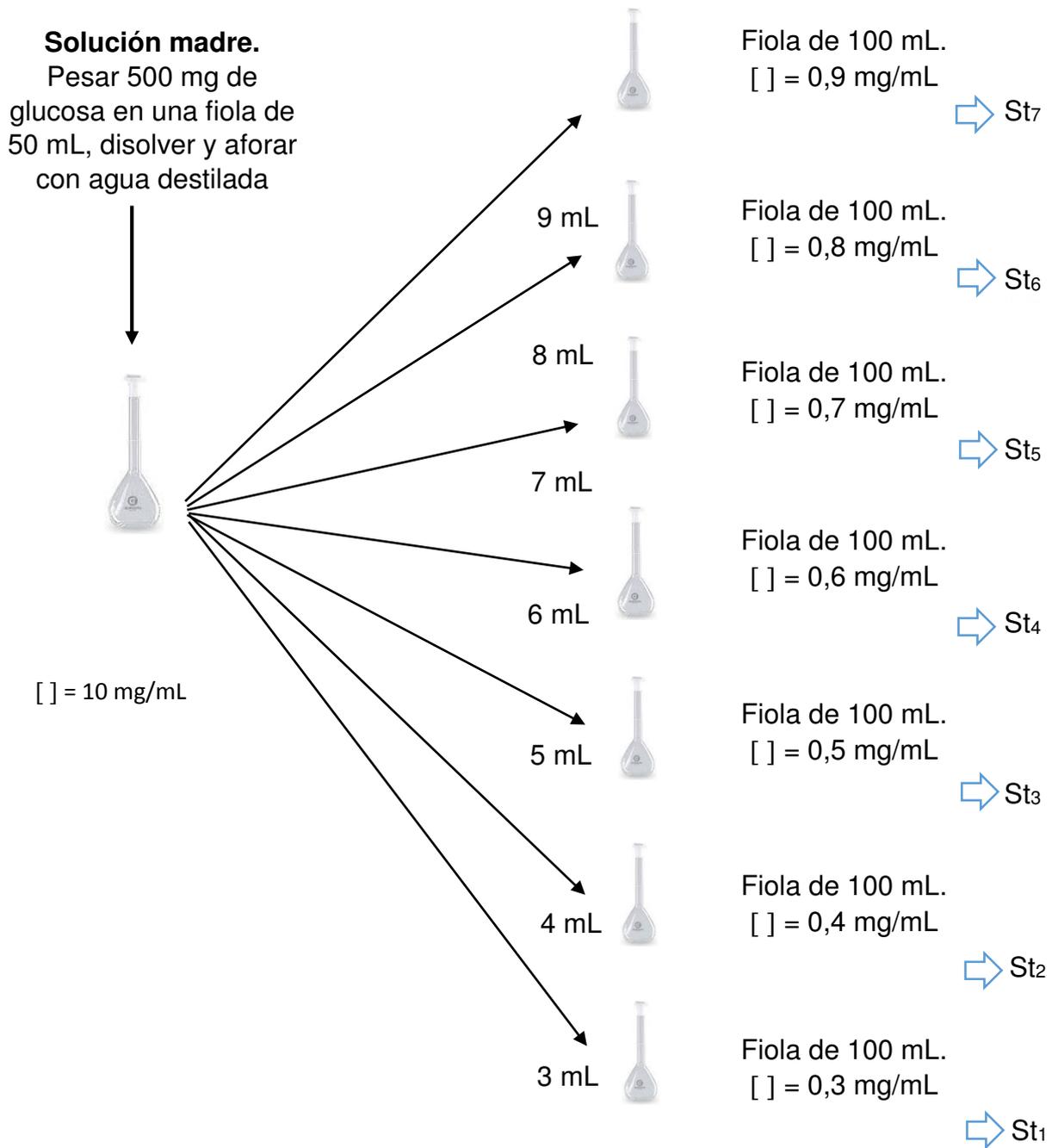
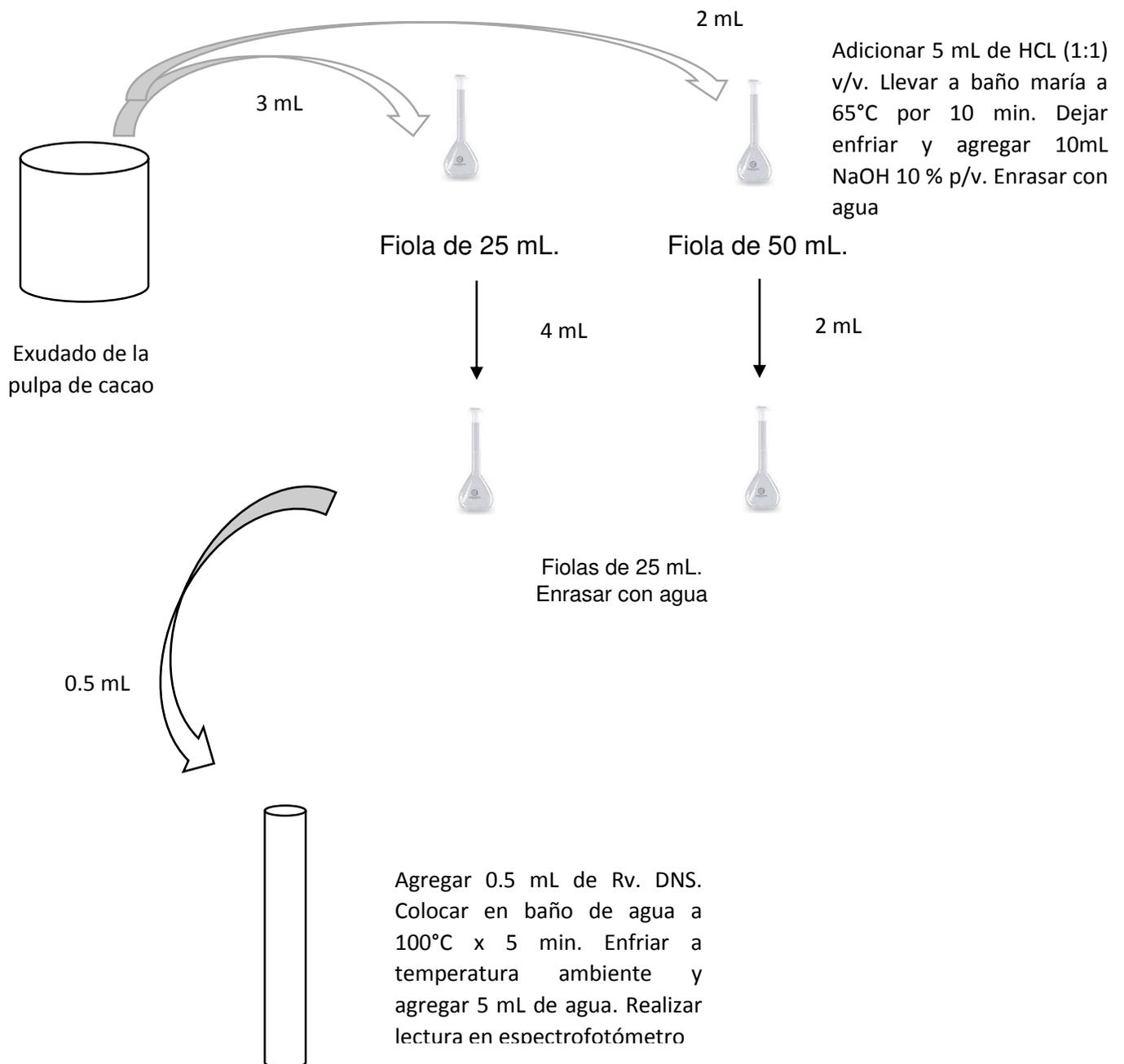


Figura N° 7: Preparación de soluciones estándares

3.2.8.5. Preparación de la muestra y desarrollo de la reacción



3.2.9. Obtención de etanol

La obtención de etanol se realizó mediante destilación simple de la muestra fermentada por un periodo de 2 horas, manteniendo la temperatura de ebullición entre 80 °C y 98 °C. El resultado esperado sería la separación de la mayor cantidad de etanol producido durante la fermentación.



Figura N° 8: Equipo de destilación simple

Se hizo uso de un destilador simple que constaba de un balón de destilación de 1000 mL, termómetro, un refrigerante de 30 cm, mangueras por donde se hizo circular el agua del caño, las cuales fueron conectadas al refrigerante, y un envase donde se recibió el destilado. Todos estos materiales se montaron haciendo uso de soportes universales.

3.2.9.1. Proceso de destilación simple

Se colocó el líquido en el balón de destilación, luego se agregó perlas de vidrio para lograr una destilación homogénea y evitar sobresaltos y finalmente se procedió a armar el equipo ⁵⁵.

Se verificó el perfecto cierre de las uniones para evitar pérdidas y hacer circular una corriente suave de agua fría a través del refrigerante, posteriormente se calentó suavemente el balón de destilación para lograr una ebullición pareja y constante. Se tomó lectura de la temperatura de ebullición, luego se destiló hasta coleccionar el líquido, se dejó enfriar y se trasvasó a un recipiente hermético ⁵⁵.

3.2.10. Determinación del contenido de etanol

El contenido se determinó utilizando el método de picnometría y se comparó con el contenido de etanol obtenido por el método de Cromatografía de Gases con Detector de Ionización a la llama.

3.2.10.1. Método 1: Picnometría

El contenido de etanol se determinó utilizando un picnómetro y las tablas de Windisch (tablas referenciales que relacionan % de alcohol y la gravedad específica del mismo a una temperatura determinada)

En primer lugar se determinó la densidad del líquido obtenido en la destilación de la muestra fermentada siguiendo el capítulo <841> de la USP 40.

Procedimiento

Se colocó el picnómetro limpio y seco en el interior de la balanza y se registró el peso.

Para pesar el picnómetro con la muestra, primero se llevó la muestra destilada a una temperatura de 25 °C y luego se añadió al interior del picnómetro, evitando en todo momento que se formen burbujas, se secó la parte externa del picnómetro y se tapó para finalmente pesarlo en la balanza analítica.

Después de lavar y secar el picnómetro se pesó el picnómetro con agua destilada, para lo cual se siguió el mismo procedimiento realizado para pesar el picnómetro con la muestra destilada.

La densidad se obtuvo mediante el cálculo de la siguiente fórmula:

$$D = \frac{p'' - p}{p' - p}$$

Donde:

p : Peso del picnómetro vacío

p'' : Peso del picnómetro con la muestra destilada

p' : Peso del picnómetro con agua destilada

Se encontró la relación de la densidad con el % de etanol de acuerdo al análisis de la Tabla Alcoholimétrica de la USP 40.

3.2.10.2. Método 2: Cromatografía de gases

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Toxicología y Química Legal utilizando el método de Cromatografía de Gases con Detector de Ionización a la Llama.

IV. RESULTADOS

4.1. Obtención del exudado de la pulpa de cacao

Se seleccionó una cantidad de 80 frutos los cuales se encontraban en buenas condiciones.

Tabla N° 6: Relación de pesos de frutos enteros y pesos de pulpa con semilla de cada fruto.

N°	Pesos de frutos enteros (g)	Pesos de pulpa con semilla (g)	% Muestra
1	1650	350	21,2 %
2	850	200	23,5 %
3	625	125	20,00 %
4	1100	250	22,7 %
5	1200	275	22,9 %
6	1025	200	19,5 %
7	1040	225	21,6 %
8	725	200	27,6 %
9	1125	250	22,2 %
10	1200	250	20,8 %
11	1225	275	22,4 %
12	1200	250	20,8 %
13	975	225	23,1 %
14	1075	200	18,6 %

15	1425	325	22,8 %
16	700	125	17,9 %
17	1050	275	26,2 %
18	1175	325	27,7 %
19	1075	350	32,6 %
20	750	250	33,3 %
21	1375	325	23,6 %
22	1325	325	24,5 %
23	1150	250	21,7 %
24	1175	275	23,4 %
25	1000	250	25,0 %
26	1125	225	20,0 %
27	850	225	26,5 %
28	725	200	27,6 %
29	1325	375	28,3 %
30	1200	250	20,8 %
31	1200	325	27,1 %
32	1200	375	31,3 %
33	1025	275	26,8 %
34	1275	300	23,5 %
35	875	300	34,3 %
36	1150	275	23,9 %
37	1000	250	25,0 %
38	1050	300	28,6 %

39	775	250	32,3 %
40	1575	325	20,6 %
41	1050	275	26,2 %
42	1150	300	26,1 %
43	1000	250	25,0 %
44	850	275	32,4 %
45	1050	200	19,0 %
46	925	250	27,0 %
47	1200	300	25,0 %
48	975	275	28,2 %
49	1075	200	18,6 %
50	875	325	37,1 %
51	925	250	27,0 %
52	1300	325	25,0 %
53	1150	250	21,7 %
54	1050	200	19,0 %
55	900	200	22,2 %
56	875	200	22,9 %
57	1025	250	24,4 %
58	725	225	31,0 %
59	1325	325	24,5 %
60	800	200	25,0 %
61	1125	250	22,2 %
62	1175	300	25,5 %

63	1200	250	20,8 %
64	1200	275	22,9 %
64	900	200	22,2 %
66	1225	275	22,4 %
67	750	200	26,7 %
68	1275	350	27,5 %
69	1150	200	17,4 %
70	1600	350	21,9 %
71	1200	300	25,0 %
72	1525	400	26,2 %
73	1275	275	21,6 %
74	1425	325	22,8 %
75	1375	325	23,6 %
76	975	200	20,5 %
77	1125	250	22,2 %
78	1350	250	18,5 %
79	1375	325	23,6 %
80	1250	275	22,0 %

Tabla N° 7: Resumen de los pesos totales y cantidad de exudado obtenido de 80 frutos de cacao

Ítem	Cantidad
Peso total de frutos enteros	88,265 g
Peso total de pulpa con semilla	21,250 g
Peso total de semillas después de obtenido el exudado	17,850 g
Peso total de semillas secas	5,600 g
Volumen total de exudado obtenido	3,230 mL
Rendimiento del exudado en relación al peso de la pulpa con semilla	15,2 %

4.2. Estudio químico de exudado

4.2.1. Análisis proximal del exudado de la pulpa del cacao

Tabla N° 8: Resultado del análisis proximal del exudado de la pulpa de cacao

PRUEBAS	MÉTODO	RESULTADOS
Proteínas	AOAC	0,69%
Humedad	AOAC	82,46%
Cenizas	AOAC	0,23%
Grasas	AOAC	0,01%
Fibras	AOAC	0,14%
Carbohidratos	AOAC	16,47%
Energía	-----	68,73%

Realizado en el Centro de Control Analítico – CCA. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Ensayos cualitativos para identificación de carbohidratos

Tabla N° 9: Resultado de los ensayos cualitativos para identificar carbohidratos

Ensayo	Presencia	Ausencia
Molish	X (Positivo para carbohidratos)	
Lugol		X (Negativo para almidón)
Barfoed	X (Positivo para disacáridos reductores)	
Bial		X (Negativo para pentosas)
Sellivanoff	X (positivo para cetosas, presencia de sacarosa y fructosa)	

4.2.2. Análisis cromatográfico en capa delgada

Se realizó el ensayo de cromatografía en capa delgada donde por las coloraciones observadas, se identificó la presencia de sacarosa y fructosa.



Figura N° 9: Cromatograma A, B, C, D Y E

Donde:

A = Exudado de cacao

B = Estándar de glucosa al 0,5 %

C = Estándar de fructosa al 0,5 %

D = Estándar de Galactosa al 0,5 %

E = Estándar de Sacarosa al 0,5 %

Determinación del pH

Se realizó la lectura del pH de 10 muestras a temperatura ambiente (entre 25 °C y 30 °C), obteniéndose en promedio un pH de 3,61.

Tabla N° 10: Lectura de pH de muestras individuales

Muestras	pH
M1	3,58
M2	3,64
M3	3,72
M4	3,43
M5	3,65
M6	3,66
M7	3,48
M8	3,71
M9	3,57
M10	3,61

4.2.3. Lectura de Sólidos solubles (grados Brix)

Se realizó la lectura de sólidos solubles a 10 muestras, obteniéndose un promedio de 16,3 grados Brix.

Tabla N° 11 : Lectura de grados Brix de muestras individuales

Muestras	Grados Brix
M1	16
M2	17
M3	16,5
M4	16
M5	16
M6	17
M7	16
M8	16
M9	16,5
M10	16

4.3. Identificación de la cepa a utilizar en la fermentación

4.3.1. Pruebas de Identificación microbiológicas

4.2.1.1. Características macroscópicas.

Tabla N° 12: Características macroscópicas

CARACTERÍSTICA	OBSERVACIÓN		
	Cepa nativa aislada del fruto de cacao	Cepa nativa aislada de la uva	Cepa de levadura comercial (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Color	De blanco a crema	Blanco	Blanco

Elevación	Convexas	Convexas	Convexas
Borde	Liso	Liso	Liso
Apariencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Forma	Circular	Circular	Circular

4.2.1.2. Características microscópicas.

Tabla N° 13: Características microscópicas

CARACTERÍSTICA	OBSERVACIÓN		
	Cepa nativa aislada del fruto de cacao	Cepa nativa aislada de la uva	Cepa de levadura comercial (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Forma	Apiculada	Elipsoidales	Elipsoidales
Presencia de filamentos	No presenta	No presenta	No presenta
Tipo de reproducción	No se observa	No se observa	No se observa

4.3.2. Caracterización Bioquímica

4.3.2.1. Ensayo – Observación de la producción de CO₂

Tabla N° 14: Determinación de presencia de CO₂

MUESTRAS	PRESENCIA DE CO ₂ (presencia de burbujas)								
	Cepa nativa aislada del fruto de cacao			Cepa nativa aislada de la uva			Cepa de levadura comercial (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
	1 ^{er} test	2 ^{do} test	3 ^{er} test	1 ^{er} test	2 ^{do} test	3 ^{er} test	1 ^{er} test	2 ^{do} test	3 ^{er} test
Agua peptonada	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	++	+	+	+	++	+
Maltosa	++	++	++	+	++	++	++	++	+
Fructosa	++++	+++	+++	++++	+++	++++	+++	+++	++++
Galactosa	+++	++	+	++++	++	++	+++	++	++
Glucosa	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

(-) Indica ausencia de CO₂

(+) Indica presencia o resultado positivo.

4.3.2.2. Ensayo – Fermentación en agar caseínpeptona rojo de fenol

Tabla N° 15: Multiplicación de colonias en Agar caseínpeptona rojo de fenol

Muestra	Multiplicación de colonias								
	Cepa nativa aislada del fruto de cacao			Cepa nativa aislada de la uva			Cepa de levadura comercial (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
	1 ^{er} test	2 ^{do} test	3 ^{er} test	1 ^{er} test	2 ^{do} test	3 ^{er} test	1 ^{er} test	2 ^{do} test	3 ^{er} test
Blanco(agar caseínpeptona rojo de fenol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilosa	++	+	++	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+++	++	++	++	+	++	+++	+	++
Maltosa	+++	++	+++	++	++	++	++	++	+
Fructosa	+++++	+++ +	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
Galactosa	++++	+++	+++	+	++	+	+	++	++
Glucosa	+++++	+++ +	+++++	+++ +	+++ +	++ ++	+++++	+++ +	+++ +

Tabla N° 16: Cambio de coloración de colonias en Agar caseínpeptona rojo de fenol

MUESTRA	CAMBIO DE COLORACIÓN (indica variación de pH)					
	Cepa nativa aislada del fruto de cacao		Cepa nativa aislada de la uva		Cepa de levadura comercial (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
Blanco(agar caseínpeptona rojo de fenol)	-	Rojo	-	Rojo	-	Rojo
Lactosa	-	Rojo	-	Rojo	-	Rojo
D-Xilosa	+	Naranja	-	Rojo	-	Rojo
Sacarosa	++	Naranja	+++	Naranja	+++	Naranja
Maltosa	++	Naranja	++	Naranja	+++	Naranja
Fructosa	+++++	Amarillo	++++	Amarillo	+++	Amarillo
Galactosa	++++	Amarillo	++	Amarillo	+++	Amarillo
Glucosa	+++++	Amarillo	+++	Amarillo	+++	Amarillo

(-) Indica ausencia de cambio de coloración

(+) Indica presencia o resultado positivo

4.3.3. Identificación de la cepa por el Método Auxonográfico

Tabla N° 17: Asimilación de compuestos de carbono

MUESTRA	Asimilación de compuestos de carbono		
	Cepa nativa aislada del fruto de cacao	Cepa nativa aislada de la uva	Cepa de levadura comercial (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Lactosa	+	-	-
D-Xilosa	+	-	-
Sacarosa	-	+	+
Maltosa	+	+	+
Fructosa	+	+	+
Galactosa	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Manitol	+	-	-
Rafinosa	+	+	+

Nota: La cepa nativa aislada del fruto de cacao fue analizada en el laboratorio Micro Biol S.A identificándose como *Kloeckera spp.*

4.4. Fermentación del exudado

4.4.3. Determinación de la concentración del inóculo

Recuento en placa

De las colonias aisladas se realizaron diluciones hasta 10^{-5} y se sembraron las últimas tres diluciones por duplicado. Las placas se incubaron a 25°C por tres días.

Tabla N° 18: Resultados en UFC del recuento en placa

	Diluciones sembradas					
	10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
	Resultados en UFC					
1 colonia	77	61	10	14	1	3
2 colonias	104	108	16	12	2	4
4 colonias	333	278	84	78	18	9
6 colonias	400	410	96	96	16	9
8 colonias	419	409	95	80	25	23
10 colonias	710	613	124	119	31	28
12 colonias	>1000	>1000	285	298	43	50

Se seleccionó la dilución 10^{-4} por tener un número de UFC entre 30 y 300.

Se realizó el recuento y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla N° 19: Resultado de UFC de la dilución 10^{-4}

Número de colonias seleccionadas	Resultado en UFC
1 colonia	$6,9 \times 10^5$
2 colonias	$1,1 \times 10^6$
4 colonias	$8,1 \times 10^6$
6 colonias	$9,6 \times 10^6$
8 colonias	$8,8 \times 10^6$
10 colonias	$1,2 \times 10^7$
12 colonias	$3,6 \times 10^7$

Se seleccionó como inóculo la dilución preparada a partir de 10 colonias ya que el número de UFC en el recuento se encuentra entre 10^6 UFC y 10^8 UFC.

Relación entre absorbancia y UFC

Tabla N° 20: Relación entre número de colonias y absorbancia del inóculo ($\lambda=625$ nm)

N° Colonias sembradas UFC	Ensayo "A"	Ensayo "B"
1	0,040	0,046
2	0,131	0,120
4	0,255	0,225
6	0,362	0,353
8	0,475	0,414
10	0,524	0,535
12	0,648	0,681
	$Y = 0,0531X + 0,0219$	$Y = 0,0551X + 0,0008$
	$R^2 = 0,9865$	$R^2 = 0,9933$
	$R = 0,99323$	$R = 0,99664$

Interpretación: La relación entre el número de colonias señala que 10 UFC de 3 mm de diámetro de la levadura a utilizar incubada a 30°C por tres días producen una absorbancia cercana a 0,524 y 0,535.

Ensayo "A": Preparado por persona "A" utilizando una asa de siembra para el recojo de las colonias.

Ensayo "B": Preparado por persona "B" utilizando torunda estéril para el recojo de las colonias.

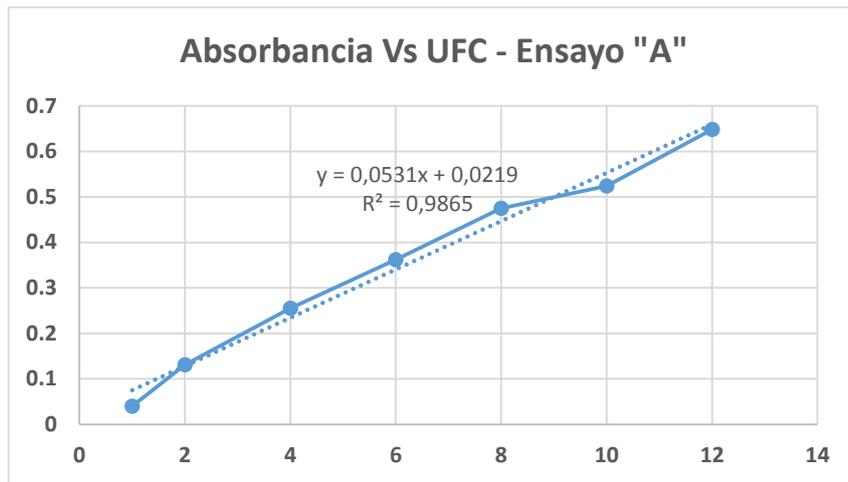


Figura N° 10: Gráfico de Absorbancia Vs UFC- Ensayo A

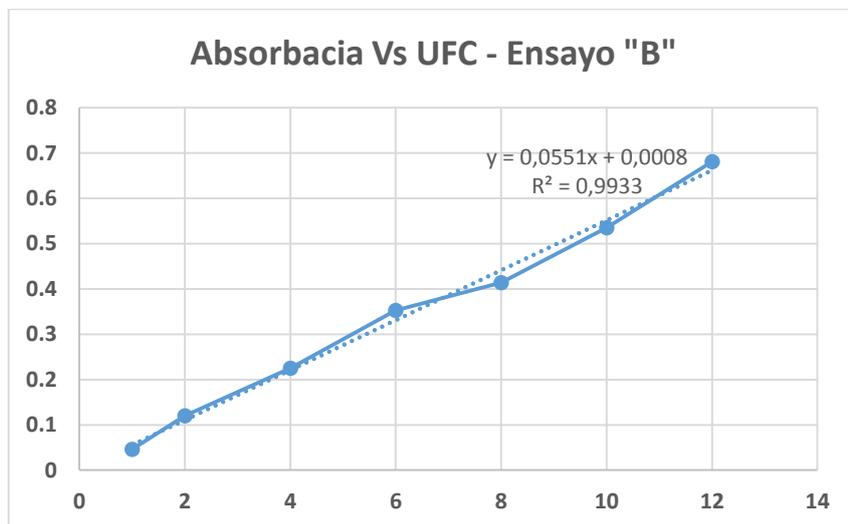


Figura N° 11: Gráfico de Absorbancia Vs UFC- Ensayo B

4.4.4. Registros de pH y grados Brix de cada muestra durante la fermentación

Fermentación de la muestra con cepa nativa aislada del cacao al 1 %

Tabla N° 21: Evolución del pH y grados Brix a lo largo de la fermentación con cepa nativa del fruto de cacao al 1 %

TIEMPO	Grados BRIX	pH
Inicial	17,0	3,510
3 horas	16,5	3,498
6 horas	16,5	3,470
9 horas	16,0	3,456
12 horas	15,5	3,450
14 horas	14,5	3,437
16 horas	14,5	3,429
18 horas	14,0	3,412
20 horas	13,5	3,390
22 horas	13,0	3,387
24 horas	12,5	3,386
26 horas	12,0	3,384
28 horas	11,5	3,370
30 horas	11,0	3,368

31 horas	10,5	3,367
32 horas	10,0	3,357
33 horas	9,5	3,351
34 horas	9,0	3,349
35 horas	9,0	3,320
36 horas	8,5	3,312

Fermentación de la muestra con cepa nativa aislada del cacao al 5 %

Tabla N° 22: Evolución del pH y grados Brix a lo largo de la fermentación con cepa nativa del fruto de cacao al 5 %

TIEMPO	Grados BRIX	pH
Inicial	17	3,633
3 horas	17	3,607
6 horas	17,0	3,550
9 horas	17,0	3,512
12 horas	17,0	3,480
14 horas	16,5	3,466
16 horas	16,0	3,438
18 horas	15,5	3,414
20 horas	13,5	3,401
22 horas	13,0	3,393

24 horas	12,5	3,387
26 horas	12,5	3,370
28 horas	12,0	3,345
30 horas	11,0	3,340
31 horas	10,5	3,338
32 horas	10,5	3,323
33 horas	10,0	3,312
34 horas	10,0	3,310
35 horas	9,0	3,307
36 horas	8,5	3,303

Fermentación de la muestra con cepa nativa aislada de la uva

Tabla N° 23: Evolución del pH y grados Brix a lo largo de la fermentación con cepa nativa aislada de la uva

TIEMPO	Grados BRIX	pH
Inicial	16,5	3,557
3 horas	16,5	3,537
6 horas	16,0	3,503
9 horas	16,0	3,489

12 horas	15,5	3,479
14 horas	15,0	3,468
16 horas	15,0	3,464
18 horas	14,5	3,445
20 horas	14,5	3,439
22 horas	14,0	3,438
24 horas	13,5	3,417
26 horas	12,5	3,402
28 horas	12,0	3,396
30 horas	11,5	3,389
31 horas	11,5	3,378
32 horas	11,0	3,366
33 horas	10,5	3,363
34 horas	10,0	3,357
35 horas	9,5	3,351
36 horas	9,0	3,351

**Fermentación de la muestra con cepa de levadura comercial
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

Tabla N° 24: Evolución del pH y grados Brix a lo largo de la fermentación con cepa de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*)

TIEMPO	Grados BRIX	pH
Inicial	17,0	3,641
3 horas	17,0	3,612
6 horas	16,5	3,589
9 horas	16,5	3,570
12 horas	16,5	3,564
14 horas	16,0	3,548
16 horas	15,5	3,535
18 horas	15,0	3,523
20 horas	14,5	3,505
22 horas	13,0	3,487
24 horas	13,0	3,470
26 horas	12,5	3,451
28 horas	12,0	3,435
30 horas	11,5	3,417

31 horas	11,5	3,401
32 horas	11,0	3,399
33 horas	10,5	3,391
34 horas	10,5	3,385
35 horas	10,0	3,376
36 horas	9,5	3,369

4.5. Cuantificación de azúcares reductores

4.5.3. Curva de calibración

Tabla N° 25: Resultados de lectura de la absorbancia de D-glucosa con DNS

N° de estándar	Concentración del estándar mg/mL (glucosa)	Absorbancias 540 nm
St-1	0,301	0,259
St-2	0,401	0,360
St-3	0,502	0,463
St-4	0,602	0,557
St-5	0,702	0,688
St-6	0,802	0,790
St-7	0,903	0,875
		$y = 1,0444x - 0,0582$ $R^2 = 0,9982; R = 0,9991$

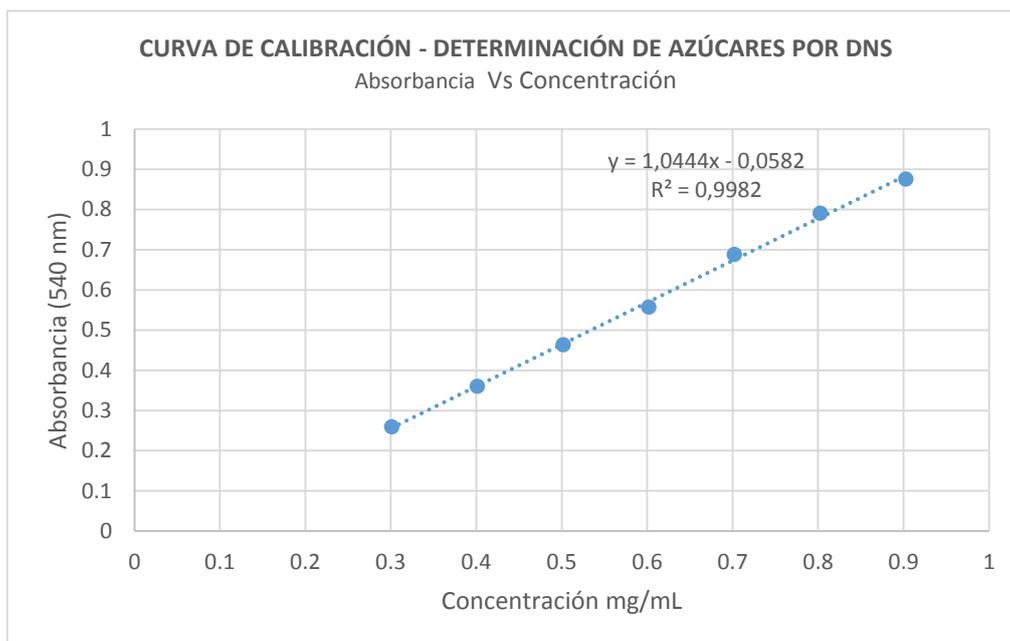


Figura N° 12: Curva de calibración del método DNS

4.5.4. Cuantificación de azúcares reductores en las diferentes fermentaciones

Fermentación con Saccharomyces cerevisiae al 1 %

Tabla N° 26: Resultados de lectura del método DNS – *Saccharomyces cerevisiae* al 1 %

Horas	Absorbancia	Concentración (mg/mL) (según curva patrón)	Factor de dilución	Concentración final (mg/mL)
0	0,541	0,574	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	179,290
6	0,508	0,542	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	169,415
12	0,454	0,490	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	153,258
18	0,361	0,401	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	125,431

24	0,252	0,297	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	92,816
32	0,355	0,396	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	20,606
36	0,279	0,323	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	16,816

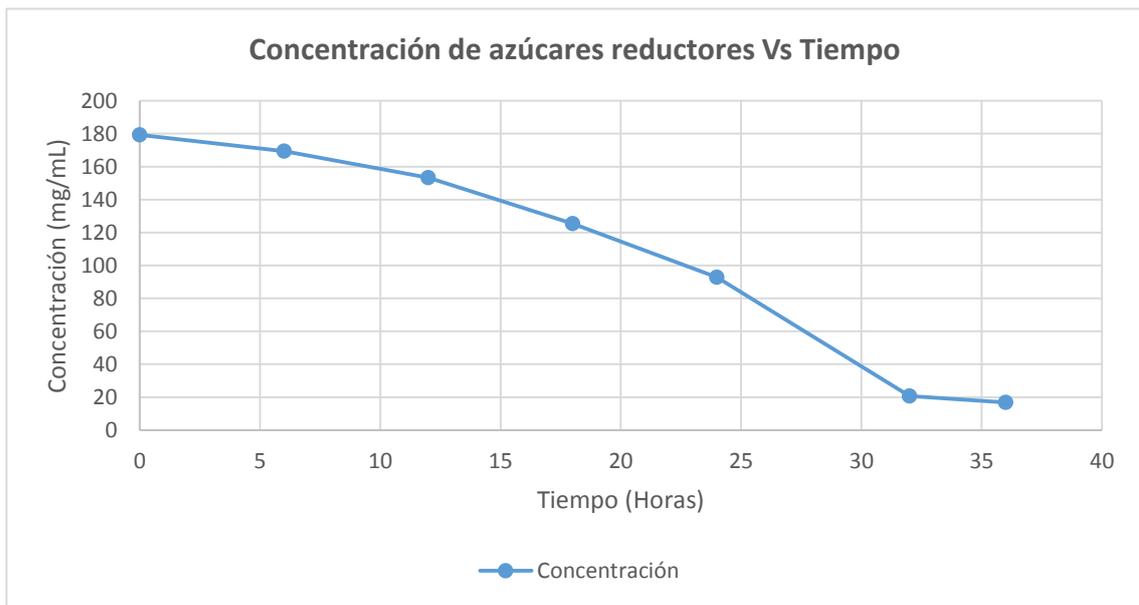


Figura N° 13: Concentración de azúcares reductores Vs Tiempo –
Saccharomyces cerevisiae al 1 %

Fermentación con cepa de uva al 1 %

Tabla N° 27: Resultados de lectura del método DNS – Cepa de uva al 1 %

Horas	Absorbancia	Concentración (mg/mL) (según curva patrón)	Factor de dilución	Concentración final (mg/mL)
0	0,541	0,574	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	179,290
6	0,513	0,547	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	170,912
12	0,463	0,499	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	155,951
18	0,359	0,399	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	124,832
24	0,258	0,303	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	94,612
32	0,359	0,399	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	20,805
36	0,289	0,332	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	17,315

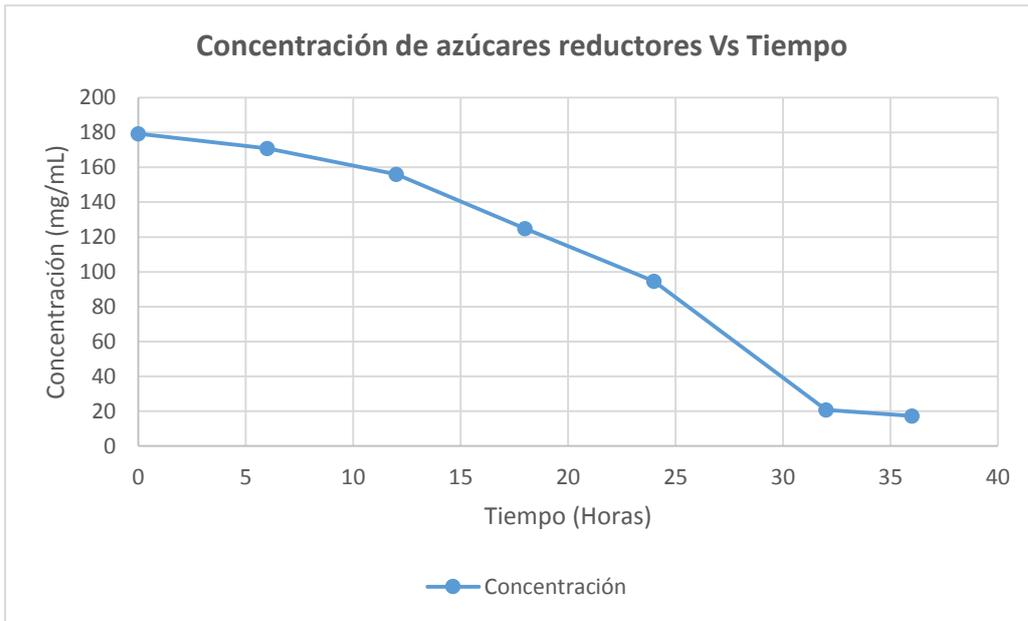


Figura N° 14: Concentración de azúcares reductores Vs Tiempo – Cepa de Uva al 1 %

Fermentación con cepa de cacao al 1 %

Tabla N° 28: Resultados de lectura del método DNS – Cepa de cacao al 1 %

Horas	Absorbancia	Concentración (mg/mL) (según curva patrón)	Factor de dilución	Concentración final (mg/mL)
0	0,541	0,574	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	179,290
6	0,502	0,536	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	167,620
12	0,478	0,513	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	160,439
18	0,352	0,393	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	122,738

24	0,276	0,320	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	99,998
32	0,344	0,385	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	20,057
36	0,268	0,312	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	16,267

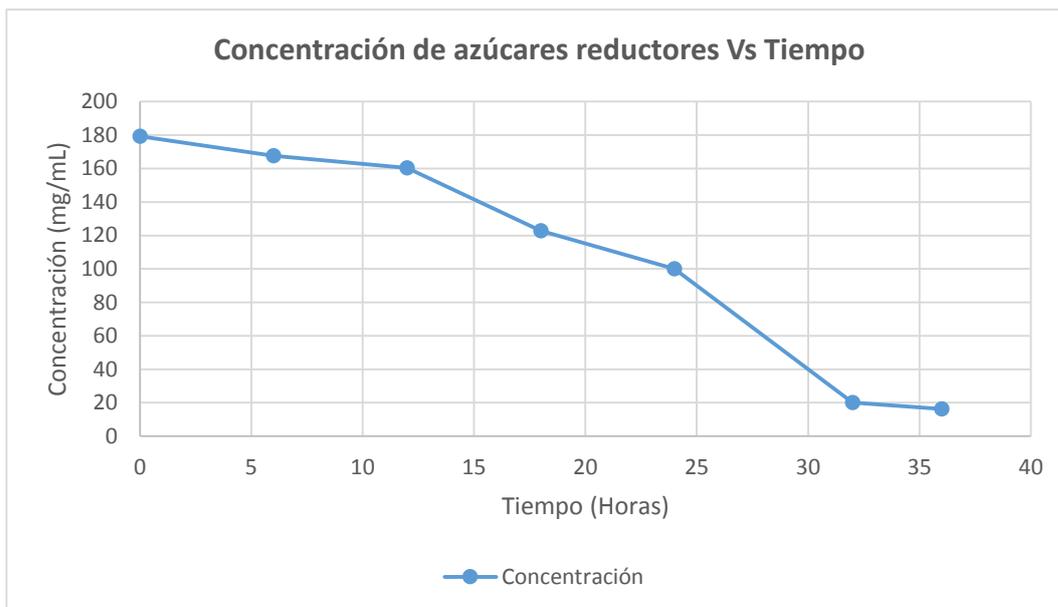


Figura N° 15: Concentración de azúcares reductores Vs Tiempo – Cepa de cacao al 1 %

Fermentación con Cepa de cacao al 5 %

Tabla N° 29: Resultados de lectura del método DNS – Cepa de cacao al 5 %

Horas	Absorbancia	Concentración (mg/mL) (según curva patrón)	Factor de dilución	Concentración final (mg/mL)
0	0,541	0,574	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	179,290

6	0,487	0,522	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	163,132
12	0,426	0,464	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	144,880
18	0,323	0,365	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	114,061
24	0,245	0,290	$\frac{50 \times 25}{2 \times 2}$	90,722
32	0,332	0,374	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	19,459
36	0,259	0,304	$\frac{25 \times 25}{3 \times 4}$	15,818

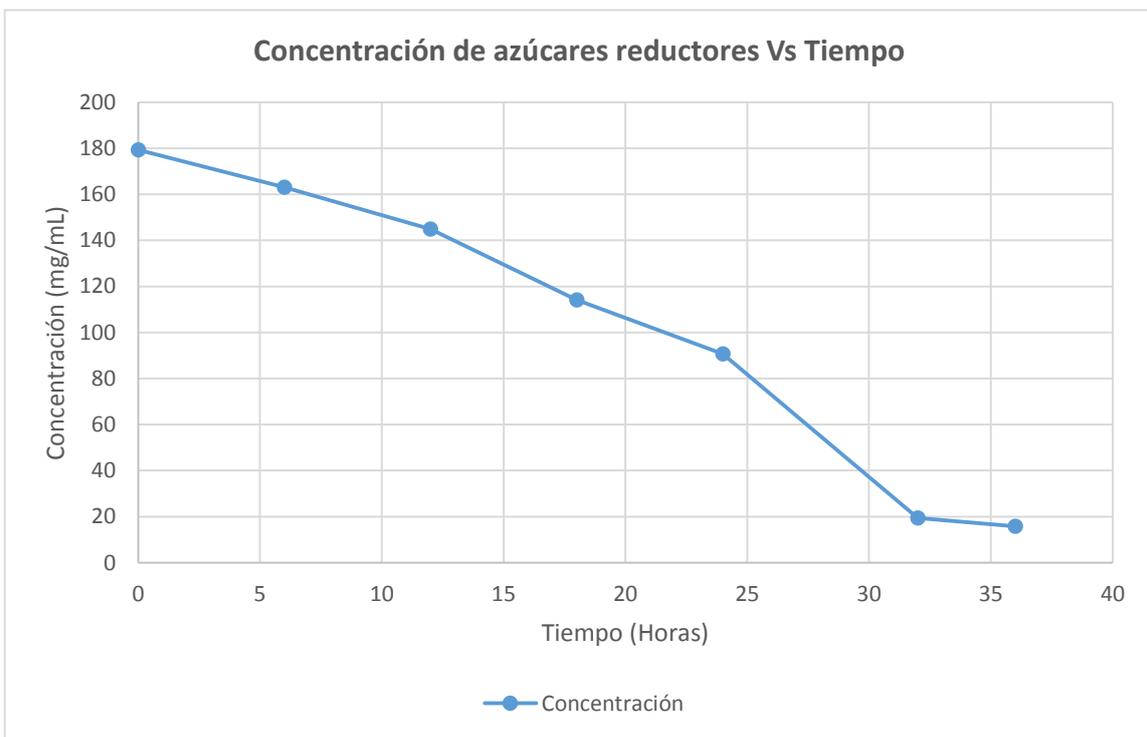


Figura N° 16: Concentración de azúcares reductores Vs Tiempo – Cepa de cacao al 5 %

En las figuras N° 13, 14, 15 y 16 se observa el comportamiento de los azúcares reductores a lo largo de la fermentación; se observa que las concentraciones

de los azúcares van disminuyendo conforme transcurre el tiempo debido a la degradación producida por las cepas.

4.6. Obtención de alcohol etílico

Después de 2 horas de destilación se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla N° 30: Cantidad de destilado obtenido de las muestras fermentadas

Muestra destilada	Cantidad obtenida
Muestra fermentada con cepa aislada del cacao al 1 %	60 mL
Muestra fermentada con cepa aislada del cacao al 5 %	50 mL
Muestra fermentada con cepa aislada de la uva al 1 %	75 mL
Muestra fermentada con cepa de levadura comercial (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) al 1 %	80 mL

4.7. Determinación del contenido de etanol

Método 1

La tabla N° 31 muestra los pesos del picnómetro vacío, el peso del picnómetro con agua y el peso del picnómetro con cada una de las muestras.

Tabla N° 31: Pesos con picnómetro

Item	Peso (g)
Peso del picnómetro vacío	27,1418
Peso del picnómetro con agua destilada	37,0008
Peso del picnómetro con destilado (cepa de cacao 1%)	36,8293
Peso del picnómetro con destilado (cepa de cacao 5%)	36,9052

Peso del picnómetro con destilado (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	36,4209
Peso del picnómetro con destilado (cepa de uva)	36,2419

FÓRMULA DE LA DENSIDAD

$$D = \frac{p'' - p}{p' - p}$$

Donde:

p : Peso del picnómetro vacío

p'' : Peso del picnómetro con la muestra destilada

p' : Peso del picnómetro con agua destilada

Utilizando la fórmula se calculó la densidad de cada una de las muestra.

Destilado obtenido de la fermentación con cepa de cacao al 1 %

$$Densidad (Cepa Cacao 1 \%) = \frac{36,8293 - 27,1418}{37,0008 - 27,1418}$$

$$Densidad (Cepa Cacao 1 \%) = \frac{9,6875}{9,859}$$

$$Densidad (Cepa Cacao 1 \%) = 0,9826$$

Destilado obtenido de la fermentación con cepa de cacao al 5 %

$$Densidad (Cepa Cacao 5 \%) = \frac{36,9052 - 27,1418}{37,0008 - 27,1418}$$

$$Densidad (Cepa Cacao 5 \%) = \frac{9,7634}{9,859}$$

$$Densidad (Cepa Cacao 5 \%) = 0,9903$$

Destilado obtenido de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* al 1 %

$$\text{Densidad (Saccharomyces cerevisiae al 1 \%)} = \frac{36,4209 - 27,1418}{37,0008 - 27,1418}$$

$$\text{Densidad (Saccharomyces cerevisiae al 1 \%)} = \frac{9,2791}{9,859}$$

$$\text{Densidad (Saccharomyces cerevisiae al 1 \%)} = 0,9412$$

Destilado obtenido de la fermentación con cepa de la uva al 1 %

$$\text{Densidad (cepa de uva al 1 \%)} = \frac{36,2419 - 27,1418}{37,0008 - 27,1418}$$

$$\text{Densidad (cepa de uva al 1 \%)} = \frac{9,1001}{9,859}$$

$$\text{Densidad (cepa de uva al 1 \%)} = 0,9230$$

Luego de comparar las densidades con la Tabla Alcolimétrica de la USP 40, se encontró el contenido de alcohol aproximado de las muestras, las mismas que van descritas a continuación:

Tabla N° 32: Contenido de etanol de las muestras por picnometría

Tipo de muestra	Contenido de etanol (%)
Destilado de la fermentación con cepa de cacao al 1 %	10,50 %
Destilado de la fermentación con cepa de cacao al 5 %	5,61 %
Destilado de la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1 %	36,96 %
Destilado de la fermentación con cepa de uva al 1 %	45,33 %

Se puede observar que el mayor porcentaje de etanol se obtuvo en las muestras fermentadas con cepa obtenida de la uva y *Saccharomyces cerevisiae*

Una vez obtenido resultados con el método 1, se puede realizar la comparación con el contenido de etanol obtenido con el método 2, tal como se indica en la tabla N° 33.

Para obtener el contenido de etanol por el método 2 se mandó a analizar las muestras en el Laboratorio de Química Legal y Toxicológico utilizando Cromatografía de Gases con Detector de Ionización a la Llama.

Tabla N° 33: Comparación de resultados del contenido de etanol obtenido por Picnometría y Cromatografía de gases.

Muestras	Contenido de etanol Método 1 (Picnometría)	Contenido de etanol Método 2 (Cromatografía de gases)
Destilado de la fermentación con cepa de cacao al 1 %	10,50 %	8,00 %
Destilado de la fermentación con cepa de cacao al 5 %	5,61 %	4,70 %
Destilado de la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1 %	36,96 %	40,08 %
Destilado de la fermentación con cepa de uva al 1 %	45,33 %	40,00 %

V. DISCUSIÓN

Según Luzuriaga⁵³, el mejor método para la obtención del exudado de la pulpa de cacao es el “método por presión”, debido a que se obtiene un mayor rendimiento en cuanto al volumen de exudado obtenido y además con este método no se altera los sólidos solubles y tampoco el pH de la muestra, es por ello que se decidió utilizar este método para obtener las muestras del exudado.

Las muestras de exudado de pulpa de cacao presentaron en su composición 0,69 % de proteínas, 82,46 % de humedad, 0,23 % de Cenizas, 0,14 % de fibras, 68,73 % de Energía y 16,47 % de Carbohidratos; datos que fueron similares a lo encontrado en un análisis fisicoquímico del exudado de la pulpa de cacao realizado por Villagómez⁵⁴ en Ecuador, cuyos datos fueron 0,4 % de proteína, 86,5 % de humedad, 0,3 % de cenizas, 0,1 % de fibras, 52,9 % de Energía y 16,5 % de Azúcares totales. Las diferencias resaltantes se estima que pueden deberse al tipo de clima, la temporada de recolección y los diferentes tipos de suelo que existen entre ambos países. Por otro lado, se encontró que la pulpa del cacao posee un promedio de 3,61 de pH y 16,3 grados Brix, lo cual indica que el exudado de la pulpa tiene una excelente concentración de azúcares y un adecuado pH, los mismos que son necesarios para lograr una buena fermentación.

A partir del fruto de cacao se aisló una cepa de levadura, cuyo análisis de sus colonias mediante pruebas de identificación microbiológicas, caracterización bioquímica y prueba de asimilación de compuestos de carbono nos

permitieron presumir que se trataba de una levadura del género *Kloeckera*, comprobándose a través de un análisis de identificación realizado en el laboratorio Micro Biol S.A, donde se identificó a la levadura como *Kloeckera spp.*

Se aisló una cepa de levadura de un mosto de uva cuyo análisis de sus colonias mediante pruebas de identificación microbiológicas, caracterización bioquímica y prueba de asimilación de compuestos de carbono fueron comparadas con los resultados de las mismas pruebas realizadas a colonias de una levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), siendo estas similares.

Con la finalidad de obtener resultados que se puedan comparar, las fermentaciones de las cuatro muestras fueron realizadas en las mismas condiciones, y siguiendo la metodología de Garzón y hernández³⁵; es decir, utilizando una muestra de igual volumen en un equipo Bioreactor en condiciones anaeróbicas, con un pH natural, a temperatura de 30 °C y con igual velocidad de agitación. Del mismo modo, se mantuvo las mismas condiciones de trabajo y el mismo periodo de tiempo al momento de realizar la Destilación simple para las cuatro muestras.

En relación a la cantidad de solidos solubles se observa un descenso durante la fermentación, llegando a los 9,5 grados Brix en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y a 8,5 grados Brix en la fermentación con cepa aislada del cacao (*Kloeckera spp*) a las 36 horas, esto se debería a que la

levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene un mejor metabolismo de los azúcares a comparación de *Kloeckera spp*, tal como lo señala Mogollón⁵⁸.

Al transcurrir el tiempo de fermentación el pH de la muestra disminuía, según Garzón y Hernández³⁵, esto se debería a que durante el proceso se incrementaría la formación de ácidos debido a que las células que poseen las levaduras atrapan los nitrógenos presentes en los aminoácidos, consiguiendo que estos pierdan su carácter anfótero y por lo tanto ocurra una disminución en el pH.

La fermentación fue realizada utilizando el pH natural del exudado el cual se encuentra en el rango de 3 a 5 que es el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras durante la fermentación según lo indicado por Leal I. et al⁶⁹.

Las diferencias existentes entre el contenido de etanol obtenido por Picnometría y el contenido de etanol obtenido por Cromatografía de Gases en las cuatro muestras se explicaría con lo señalado por Atares⁶¹, quien indica que el método por Picnometría es simple ya que se realiza de manera manual, y por consiguiente se requiere ciertas destrezas y precauciones durante el proceso para que los resultados sean fiables. Por lo tanto, se considerarán los resultados obtenidos por Cromatografía de gases por ser estos más exactos y fiables.

Del contenido de etanol de las cuatro muestras, obtenidas mediante Cromatografía Gaseosa, se encontró que las muestras trabajadas en la

fermentación con cepas de levadura comercial 1 % y cepa de la uva al 1 % obtuvieron porcentajes de alcohol de 40,08 % y 40 % respectivamente, lo cual fue muy superior en comparación con el porcentaje de alcohol obtenidas con las muestras que se fermentaron con cepas del cacao utilizando inóculo al 1 % y 5 %, las cuales fueron 8 % y 4,7 % respectivamente; esto se debería al tipo de levadura utilizada en la fermentación, ya que estas últimas cepas extraídas del cacao corresponden a una levadura identificada como *Kloeckera spp* la cual según Mogollón⁵⁸ es apta como alternativa para realizar la fermentación de bebidas con bajo grado alcohólico. Asimismo, los resultados de las fermentaciones con cepa de cacao guardan relación con lo expuesto por Álvarez, Zamora y Acedo⁵⁹ quienes indican que *Kloeckera spp.* corresponde a un género de levaduras no *Saccharomyces*, las cuales crecen durante los primeros días (4-6) y luego mueren por su intolerancia a las altas concentraciones de etanol por arriba del 6 % y cuyo efecto principal durante la fermentación es el de mejorar la calidad sensorial, esto se corrobora con otro estudio realizado por Hernández, Trujillo y Durán⁵⁷, donde a partir de la uva obtuvieron especies de levadura entre ellas *Kloeckera spp*, la cual según su investigación correspondería a una especie fermentativa que ejerce su función en la fase inicial de la fermentación del mosto, logrando sintetizar componentes que generan aroma, es por ello que es necesario para lograr el bouquet durante la producción del vino.

El bajo porcentaje de etanol obtenido de la muestra tratada con *Kloeckera spp*. Es similar a lo indicado por Estela et al⁶⁰, quienes refieren que ésta levadura produce aproximadamente 4,48 % v/v de etanol.

Teniendo en cuenta que el mayor rendimiento de etanol fue obtenido de la muestra fermentada con cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y considerando que la producción de grano de cacao a nivel nacional durante el periodo 2012 al 2013 fue de 58 000 toneladas según lo descrito por Huamán y Hurtado²³, se calcula que de esta producción se obtendría alrededor de 33 millones de litros de exudado, los cuales equivaldrían a aproximadamente 5 millones de litros de etanol al 40,08 %.

VI. CONCLUSIONES

El exudado de la pulpa de cacao, obtenido en el caserío Santa Lucía del departamento de San Martín, contiene 0,69 % de proteínas; 82,46 % de humedad; 0,23 % de cenizas; 0,01 % de grasas; 0,01 % de grasas; 0,14 % de fibras; 16,47 % de carbohidratos y 68,73 % de energía. Además, el exudado tuvo un pH promedio de 3,61 y promedio de 16,3 grados Brix.

Se aislaron e identificaron dos cepas nativas, una aislada a partir del fruto de cacao, la cual fue identificada como *Kloeckera spp*, mientras que la otra cepa fue aislada a partir de la uva e identificada como una levadura perteneciente al género *Saccharomyces*; ambas demostraron poseer capacidad de fermentación.

Debido a que se realizó un trabajo a escala de laboratorio, se hizo uso de un equipo implementado de tal modo que reúna las condiciones necesarias para poder realizar la fermentación, logrando obtener un producto fermentado final que posteriormente se destiló hasta la obtención de etanol.

Se determinó el porcentaje de etanol de las muestras destiladas, encontrándose que el contenido de etanol de las muestras fermentadas con cepa de levadura comercial y cepa obtenida de la uva fue de 40,08 % y 40 % respectivamente, mientras que el contenido de etanol obtenido de las muestras fermentadas con cepas de cacao al 1 % y 5 % fue de 8 % y 4,7 % respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

Se puede hacer un estudio alternativo para determinar el rendimiento de etanol obtenido utilizando muestras fermentadas con inóculos, de cepa de levaduras aisladas del cacao, en diferentes concentraciones para de esa manera encontrar un resultado más preciso.

Para mejorar el trabajo, durante la fermentación se debe realizar el análisis de recuento microbiano de cada muestra extraída para evaluar que esta no se encuentre contaminada por otras impurezas.

Considerando que las levaduras fermentadas a un pH 4 produce una mayor concentración de etanol y en un menor tiempo según lo indicado por Leal I. et al⁶⁹ se recomienda utilizar una solución buffer que mantenga este pH y de ese modo se obtenga mejores rendimientos.

Tomando en cuenta el rendimiento de etanol obtenido del exudado de la pulpa de cacao, se recomienda realizar un estudio socioeconómico para determinar la viabilidad del aprovechamiento del exudado para generar combustible y por ende mejorar la situación socioeconómica de los agricultores.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Gouzy J, Salse J, Aury J, Droc G, Guiltinan M, Argout X, et al. The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*. 2010;43(2):101-108.
- 2.- Müller M, Gama-Rodrigues A, Corrêa F, Ramos J. Produção de serapilheira em sistema agroflorestal multiestratificado no Estado de Rondônia, Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*. 2006; 30(6):1099-1105.
- 3.- Carvalho R, Bispo E, Santos C, Santana L. Aproveitamento tecnológico do "mel de cacau" (*Theobroma cacao* L) na produção de geleia sem adição de açúcar. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2014;36(3):640-648.
- 4.- Sousa LS. Atividade enzimática das proteases e suas isoenzimas no processamento de fermentação de dois cultivares de cacau (*Theobroma cacao* L.) produzido no sul da Bahia, Brasil. [Tesis para optar el grado de Maestría en Ciencias de los Alimentos]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2015.
- 5.- Jaimes M, Gonzales C. Desarrollo experimental del proceso para la obtención de jugo derivado del mucílago del cacao. [Tesis para optar por el Título de Ingeniero Químico]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 2005.
- 6.- Teneda LW. Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.). 1st ed. Andalucía: Universidad Internacional de Andalucía; 2017.
- 7.- MINAGRI- Ministerio de Agricultura y Riego. Estudio del Cacao en el Perú y en el Mundo. Lima: MINAGRI; 2015 p. 18-19.

- 8.- Comissão executiva do plano da lavoura cacauera. Sistema de produção de cacau para a amazônia brasileira. Belem: Paulo Silva Neto; 2018 p. 10-12.
- 9.- *Theobroma cacao* L. Plants of the World Online. Kew Science [Internet]. Plants of the World Online. [acceso 19 January 2018]. Disponible en : <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:320783-2#distribution-map>
- 10.- Silva C, Venturieri G, Figueira A. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification, and characterization of interspecific hybrids. *Acta Botanica Brasilica*. 2004;18(2):333-341.
- 11- Dostert N, Roque J, Asunción C. Hoja botánica: Cacao. Lima: Ministerio del Ambiente; 2012 p. 2-4.
- 12.- Huamán M, Hurtado de Mendoza K. Caracterización sensorial de salsa a base de *Pleurotus ostreatus*, cultivados en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.). [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
- 13.- Aldave G. Efecto de la temperatura y tiempo de tostado en los caracteres sensoriales y en las propiedades químicas de los granos de cacao (*Theobroma Cacao* L.) procedente de Uchiza, San Martín-Perú para la obtención de NIBS. [Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias de los Alimentos]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016.
- 14.- Popenoe H, Comerford N, Hall H, Yuncong Li, Arévalo E, Zuniga L, Baligar V. Cover crops alter phosphorus soil fractions and organic matter

accumulation in a Peruvian cacao agroforestry system. *Agroforestry Systems*. 2010;80(3):447-455

15.- M & O Consulting. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. Informe de consultoría. Proyecto de cooperación UE-Perú en materia de asistencia técnica relativa al comercio - Apoyo al programa estratégico nacional exportaciones (PENX 2003-2013); 2008.

16.- Olukunle O, Ogunlowo A, Ndukwu M. Cocoa Bean (*Theobroma cacao* L.) Drying Kinetics. *Chilean journal of agricultural research*. 2010;70(4):633-639.

17.- Zhang D, Bailey B, Gardini E, Baligar V, Zuñiga-Cernades L, Arevalo-Arevalo C, Meinhardt L, Motilal L. Dissecting Genetic Structure in Farmer Selections of *Theobroma Cacao* in the Peruvian Amazon: Implications for on Farm Conservation and Rehabilitation. *Tropical Plant Biol*. 2011;4(2):106–116.

18.- Chia J. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma Cacao* L.) de la UNAS – Tingo María. [Tesis par optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.

19.- Rufino L. Fortalecimiento de la cadena productiva de cacao, en las provincias de San Ignacio, Jaén y Celendín. Expediente técnico. Cajamarca, 2008.

- 20.- Cuatrecasas J. Cacao and its allies: A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contributions from the United States National Herbarium. 1964; 35: 379-614.
- 21.- International Cocoa Organization (ICCO). ANNUAL REPORT 2014/2015. Abidjan: ICCO; 2017 p. 37-39.
- 22.- Bennett A. Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. Trends in Plant Science. 2003; 8(12):561-563.
- 23.- Huamán M, Hurtado de Mendoza K. Caracterización sensorial de salsa a base de *Pleurotus ostreatus*, cultivados en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.). [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial], Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
- 24.- Bonnot F, Lachenaud P, Oliver G. Use of floral descriptors to study variability in wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. Genetic Resources and Crop Evolution, 1999; 46(5):491-500.
- 25.- García L. Catálogo de cultivares de cacao del Perú. Ministerio de Agricultura-DEVIDA. 2010.
- 26.- García L. Recopilación y análisis de información científica para la elaboración de la hoja botánica del cacao (*Theobroma cacao* L.), cv. “porcelana” de Piura. Informe de consultoría. Tingo María, Perú. 2011.
- 27.- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). “El Perú se convertirá en el primer exportador mundial de cacao orgánico en el año 2021”, 2017.
- 28.- Jiménez F, Bonilla M. Aprovechamiento de mucílago y maguey de cacao (*Theobroma Cacao*) fino de aroma para la elaboración de mermelada. [Tesis

de Grado Previa a la Obtención del título de Ingenieros Agroindustriales],
Guaranda-Ecuador: Universidad Estatal de Bolívar; 2012.

29.- African Plants Database (version 3.3.4). Conservatoire et Jardin
botaniques de la Ville de Geneve and South African National Biodiversity
Institute, Pretoria, [http:// www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/](http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/) [11.07.2011]

30.- Alexandre R, Costa P, Marques H, Chagas K, Filho J. Caracterização
de frutos de clones de cacaueiros na região litoranea de São Mateus, ES.
Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 2015; 19 (8): 785-
790.

31.- Penha E, Matta M. Características físico-químicas e microbiológicas da
polpa de cacau. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 1998;33 (11), 1945-
1949.

32.- Brack Egg, Antonio. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del
Perú. Cusco. CBC, 1999. Pág. 222

33.- Carrillo A., León A. Desarrollo experimental del proceso para la
obtención de una bebida fermentada a partir del mucilago del cacao. [Tesis
para optar por el título de Ingeniero Químico]. Bucaramanga: Universidad
Industrial de Santander; 2006.

34.- Pradhan R, Nag A. Production of etanol from bagasse. A thesis
submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of bachelor
of technology in chemical engineering, Department of chemical Engineering,
National Institute of technology, Rourkela; 2007.

- 35.- Garzón S, Hernández C. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* Silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida Utilis* ATCC 9950. [Tesis para optar el grado para optar el Título de Químico Industrial]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2009.
- 36.- Dacosta O, Vázquez H. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. INGENIERÍA investigación y tecnología VIII. 2007;4: 249-259.
- 37.- Tomasso Mauricio. Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la Republica Uruguay. Facultad de Química, 2004.
- 38.- Lorenzo M, Fajardo M, Lorenzo D, Del Risco C, Pérez J. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel de *Apis mellifera*. Estación Experimental Apícola. Cuba, 2005.
- 39.- Arimuya S, Tecco E. Obtención de etanol a partir del residuo lignocelulósico cervecero de la cervecería Amazónica – Iquitos. [Tesis para optar el título de Ingeniero Químico], Iquitos – Perú: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Facultad de Ingeniería Química; 2014.
- 40.- Gonçalves et al. 2010, Adaptation of [dinitrosalicylic acid](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/ay/c0ay00525h) method to microtiter plates. Royal Society of Chemistry. Recuperado de <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/ay/c0ay00525h>
- 41.- Delgado M. Utilización de Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), para la predicción del contenido de almidón en 18 variedades de papa nativa (*Solanum tuberosum* – ssp. *tuberosum*). [Tesis

para optar el grado de ingeniero en alimentos]. Chile: Universidad Austral de Chile; 2009.

42.- Sarmiento S, Fajardo E. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis para optar el título de Microbiólogo industrial]. Bogotá-Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.

43.- Harris D.C. Análisis Químico Cuantitativo. 6ta ed. Barcelona-España. Reverte; 2007, p.924.

44.- Sierra I. et al. Análisis Instrumental, Algunas Herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al Espacio Europeo de Educación superior. La Coruña-España. Netbiblo; 2009, p.256.

45.- León B. Seguimiento en línea de contaminantes de aguas residuales por medio de espectrofotometría (Tesis para optar el grado de Maestro en Ingeniería). México:Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.

46.- Barranzuela M, Zola M. Estudio experimental de la obtención de Bioetanol a partir de cáscara de plátano en Piura, Perú. [Tesis para optar por el Título de Ingeniero Industrial y de Sistemas]. Piura: Universidad de Piura; 2017.

47.- Pistonesi H, Bravo V, Nadal G, Bouille D. Aporte de los biocombustibles a la sustentabilidad del desarrollo en América Latina y el Caribe: Elementos para la formulación de políticas públicas. CEPAL-Colección documentos de proyectos. 2008.

48.- Los biocombustibles avanzados desempeñarán un papel crucial en los países en desarrollo, según un informe de la UNCTAD. (23 de febrero del 2016). Recuperado de

<https://unctad.org/es/Paginas/PressRelease.aspx?OriginalVersionID=294>

49.- Morelos, J. Análisis de la variación de la eficiencia en la producción de biocombustibles en América Latina. Estudios Gerenciales, 32, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.estger.2016.01.001>

50.- Dominguez S. Perú tiene condiciones para ser principal exportador de etanol en la región. ANDINA- Agencia Peruana de Noticias. (07 de julio del 2016). Recuperado de <https://andina.pe/agencia/noticia-peru-tiene-condiciones-para-convertirse-potencia-exportadora-etanol-620288.aspx>.

51.- Duque V, Rincón S. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases (GC-FID) y extracción en fase sólida (SPE) para la determinación de contaminantes emergentes de tipo productos de cuidado personal. [Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de tecnólogo químico], Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira., 2014.

52.- Domínguez M. Diseño de un espectrofotómetro de dos mediciones simultáneas para recubrimientos inhomogéneos. [Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.

53.- Luziriaga D. Extracción y aprovechamiento del mucílago de cacao (*Theobroma cacao*) como materia prima en la elaboración de vino. [Tesis previo a la obtención del título de Ingeniería de alimentos]. Quito:Universidad Tecnológica Equinoccial; 2012.

- 54.- Villagómez, S. Optimización y aprovechamiento del residuo (exudado del mucílago) de la almendra fresca del cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN51 en la elaboración de vinagre. [Tesis previo a la obtención del título de Ingeniero de alimentos]. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial; 2013.
- 55.- Montero M. Destilación simple y fraccionada como estrategia metodológica para fortalecer el aprendizaje de la separación de los componentes de una mezcla en los estudiantes de primer año de bachillerato del colegio Hernán Gallardo Moscoso de la ciudad de Loja periodo académico 2013-2014. [Tesis previa la obtención del grado de Licenciada en ciencias de la Educación Mención Químico Biológicas]. Ecuador: Universidad Nacional de Loja; 2016.
- 56.- Ambuludi M. Implementación de un destilador simple para la obtención de etanol a partir del penco azul (*Agave americana*) para la planta de alimentos del campus Juan Lunardi Paute. [Producto de grado previa a la obtención de título: Ingeniero agropecuario industrial]. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca; 2014.
- 57.- Hernández J, Trujillo Y, Durán D. Contenido fenólico e identificación de levaduras de importancia vínica de la uva Isabella (*Vitis labrusca*) procedente de villa del rosario (Norte de Santander). Revista de la facultad de química farmacéutica. 2011; 18(1): 17-25.
- 58.- Mogollón G. Producción de alcohol de la levadura nativa *Kloeckera spp.* Aislada de la chicha de choclo utilizando dos sustratos. [Trabajo previo a la obtención del título de Ingeniería de Alimentos]. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial; 2016.

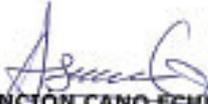
- 59.- Álvarez M, Zamora K y Acedo E. Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. Revista latinoamericana de Microbiología. 2009; 52 (1-2): 50-63.
- 60.- Estela W, Rychtera M, Melzoch K y Guerrero M. Influencia de la aireación en la actividad fermentativa de *Kloeckera epiculata* durante la fermentación de jugo de manzana. 2012; 17(2): 309-322.
- 61.- Atares L. Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia; 2011.
- 62.- Rodríguez J. Manual de Prácticas de Bioquímica. 4ª Ed. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León; 1987.
- 63.- Farag S. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists. 1979; 20(3): 251-254.
- 64.- Miranda D. et al. Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces spp.* Nativas de viñedos en Queretano, México. 2015; 49(7): 759-773.
- 65.- Prats G. Microbiología Clínica. Barcelona: Editorial Médica Panamericana; 2006.
- 66.- Fernández M García P, y Paredes F. Microbiología Clínica Práctica. España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cadiz; 1994.
- 67.- Urmeneta A. et al. Manual Práctico de Microbiología. Barcelona: Masson; 1988.

68.- Carrera E, Bello D, Díaz Y. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 2006; 15(2): 45-50.

69.- Leal I, Hernandez R, Tarantino G, Morán H. Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*. Multiciencias. 2014; 14(4): 375-381.

IX. ANEXOS

Anexo N° 1: Clasificación botánica de *Theobroma cacao* L.

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA MUSEO DE HISTORIA NATURAL</p>	
<p><i>"Año del Buen Servicio al Ciudadano"</i></p>		
<p>CONSTANCIA N°094 -USM-2017</p>		
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (fruto) recibida de John Jaimito TRUJILLO DOMINGUEZ, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: <i>Theobroma cacao</i> L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).</p>		
<p>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</p>		
<p>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</p>		
<p>SUBCLASE: DILLENIIDAE</p>		
<p>ORDEN: MALVALES</p>		
<p>FAMILIA: STERCULIACEAE</p>		
<p>GENERO: Theobroma</p>		
<p>ESPECIE: <i>Theobroma cacao</i> L.</p>		
<p>Nombre vulgar: "cacao" Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.</p>		
<p>Lima, 26 de mayo de 2017</p>		
	<p> Mag. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRÍA JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>	
<p>ACE/ddb</p>		
<p>Av. Arenales 1256, Jesús María Ápda. 14-0434, Lima 14, Perú</p>	<p>Teléfono: (51)471-0117, 470-4471 265-6819, 619-7000 anexo 5703</p>	<p>e-mail: museohn@unmsm.edu.pe http://museohn.unmsm.edu.pe</p>

Anexo N° 2: Análisis proximal del exudado de la pulpa de cacao

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS (Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA) FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA CENPROFARMA CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA	
---	--	---

PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00191-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 004464/2017
SOLICITADO POR	: JOHN TRUJILLO DOMINGUEZ
MUESTRA	: EXUDADO DE PULPA DE CACAO
N° DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 01 frasco de plástico
FECHA DE RECEPCIÓN	: 08 de Junio del 2017
FECHA DE FABRICACION	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

PRUEBAS	MÉTODOS	RESULTADOS
PROTEÍNAS	AOAC	0,69%
HUMEDAD	AOAC	82,46%
CENIZAS	AOAC	0,23%
GRASAS	AOAC	0,01%
FIBRAS	AOAC	0,14%
CARBOHIDRATOS	AOAC	16,47%
ENERGÍA	-----	68,73 Kcal/100g

Lima, 23 de Junio del 2017


Q.F. Nelson Bautista Cruz
 Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓNICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico - Lima 1 - Perú ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe	 
--	--

Anexo N° 3: Identificación de levadura obtenida del fruto de cacao



INFORME DE ENSAYO N° 1358 - 2017

Pág. 1 de 1

CLIENTE	: JOHN JAIMITO TRUJILLO DOMÍNGUEZ
DIRECCION	: Jr. Colón N° 953- Callao - Callao
NOMBRE DEL PRODUCTO	: CULTIVO MICROBIANO
INFORMACIÓN ADICIONAL	: No indica
LOTE / FECHA DE VENCIMIENTO	: No aplica / No aplica
PRESENTACIÓN	: Placa descartable
TIPO DE MUESTRA	: No aplica
NÚMERO ASIGNADO A LA MUESTRA	: 1710071
CANTIDAD RECIBIDA	: 01 placa
CONDICIÓN DE LA MUESTRA	: Muestra transportada a temperatura de ambiente.
FECHA DE RECEPCIÓN	: 24.10.17
FECHA DE INICIO	: 24.10.17
FECHA DE TÉRMINO	: 02.11.17
TIPO DE ANÁLISIS	: Microbiológico
DOCUMENTO DE REFERENCIA	: Solicitud de análisis N° 17-0516

PARÁMETRO EVALUADO	RESULTADO
Identificación de levadura	<i>Kloeckera spp</i>

COMENTARIO:

Kloeckera spp: Esta levadura vinica es anaerobia facultativa, presenta un metabolismo respiratorio a condiciones aeróbicas y son sensibles a la variación de la concentración de oxígeno en el medio. Asimismo, durante la fermentación produce una variedad de compuestos químicos, como: glicerol, 1-propanol, 1 y 2- Butanol, 2 Metil- propanol, 2 y 3 Metil-butanol.

Método:

Aislamiento e Investigación de microorganismos en alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y otros: MA-022-4

Miraflores, 02.11.17

MICROBIOL S.A.

Blg. Gladys Milagros Rodríguez Flores
C.B.P. 4264
Jefe de Laboratorio

MICROBIOL S.A.

Blg. Eliana Benedetti Mallqui
C.B.P. 2381
Gerente Técnico

Los resultados presentados corresponden sólo a las muestras ensayadas.
Queda absolutamente prohibida la reproducción total o parcial de este informe de ensayo sin autorización de MICROBIOL S.A.

JOAQUIN CAPELO N° 222
LIMA 18 - PERÚ

microbiol@microbiol.com.pe
microbiol@speedy.com.pe
cursosmicrobiol@gmail.com

Teléfonos: (511) 441 3939
(511) 221 4298
www.microbiol.com.pe

Anexo N° 4: Contenido de etanol del destilado de la fermentación con cepa aislada de cacao al 1 %.

N° de Dictamen Pericial 2018002000517

Fecha de impresión 05/01/2018 11:33

N° Pag.

1 de 1



MINISTERIO PÚBLICO
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Sub Gerencia de Laboratorio de
Toxicología y Química Legal

SERVICIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

ELEMENTO

DICTAMEN PERICIAL N° 2018002000517

DESCRIPCIÓN: MUESTRA 01 - FRASCO (01), CONTENIENDO DESTILADO DE FERMENTACION CON CEPAS AISLADAS DE CACAO AL 1%.

REMLORFICIO S/N

SOLICITADO POR: PARTICULAR - JHON TRUJILLO DOMÍNGUEZ

FECHA DE INCIDENTE: 05/12/2017

FECHA DE RECEPCIÓN: 08/12/2017 F.CIERRE: 05/01/2018

ANALISIS SOLICITADO: DOSAJE DE ALCOHOL ETÍLICO

MUESTRA: FRASCO

Investigación Solicitada: y/o Descripción de Muestra:
CON CONTENIDO.

DETERMINACIÓN DE: ALCOHOL ETÍLICO

CANTIDAD: 80 g 000 ALCOHOL ETÍLICO

MÉTODO: CROMATOGRAFIA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACION A LA LLAMA.

OBSERVACIONES: LA CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA ANALIZADA CORRESPONDE A 8.00 g % MUESTRA AGOTADA DURANTE EL ANALISIS.

CONCLUSIONES: LA MUESTRA ANALIZADA PRESENTA 80.00 g 000 DE ALCOHOL ETÍLICO

Lima, 05 de Enero de 2018

Jacqueline R. Carrasco Zepeda
C.Q.F.P. 1386
D.M.L. 2672158

RIVAS ALTEZ WALTER
C.Q.F.P. N° 13864
DNI: 09238422
Domicilio Legal: Jr. Cangallo 518 Cercado de Lima
Walter Rivas Altez
Químico Farmacéutico
C.Q.F.P. 13864
DNI: 09238422



MINISTERIO PÚBLICO
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
SERVICIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE
Laboratorio de Toxicología y Química Legal

Jacqueline R. Carrasco Zepeda
C.Q.F.P. 1386
D.M.L. 2672158

05 ENE 2018

LEYENDA:

Según Ley 27753 del 07/06/2002 Positivo mayor de 0.5 g 0/00.

Según Ley 29438 del 16/11/2005 Positivo mayor de 0.25 g 0/00 para conductores de Transportes público y de pasajeros, mercancías o carga en general.

Anexo N° 5: Contenido de etanol del destilado de la fermentación con cepa aislada de cacao al 5 %.

N° de Dictamen Pericial: 2018002000521 Fecha de Impresión: 05/01/2018 11:35 N° Pág.: 1 de 1



MINISTERIO PÚBLICO
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Sub Gerencia de Laboratorio de
Toxicología y Química Legal

SERVICIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

ELEMENTO
DICTAMEN PERICIAL N° 2018002000521

DESCRIPCIÓN: MUESTRA 02 - FRASCO (01), CONTENIENDO DESTILADO DE FERMENTACION CON CEPAS AISLADAS DE CACAO AL 5%.

RML/OFICIO S/N

SOLICITADO POR: PARTICULAR - JOHN TRUJILLO DOMINGUEZ

FECHA DE INCIDENTE: 05/12/2017

FECHA DE RECEPCIÓN: 09/12/2017 F.CIERRE: 05/01/2018

ANÁLISIS SOLICITADO: DOSAJE DE ALCOHOL ETÍLICO

MUESTRA: FRASCO

Investigación Solicitada y/o Descripción de Muestra:
CON CONTENIDO

DETERMINACIÓN DE: ALCOHOL ETÍLICO

CANTIDAD: 47 g 0/00 ALCOHOL ETÍLICO

MÉTODO: CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN A LA LLAMA

OBSERVACIONES: LA MUESTRA ANALIZADA CORRESPONDE A 4.70 g %
MUESTRA AGOTADA DURANTE EL ANÁLISIS

CONCLUSIONES: LA MUESTRA ANALIZADA PRESENTA 47.00 g 0/00 DE ALCOHOL ETÍLICO

Lima, 05 de Enero de 2018

J. Gabriel Fernández
C.Q.F.P. 13850
D.N.I. 36721956



MINISTERIO PÚBLICO Domicilio Legal: Jr. Cangallo 818 Cercado de Lima
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
GERENCIA DE TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA LEGAL
Laboratorio de Toxicología y Química Legal

Mg. Q.F.P. Carlos Martínez
C.Q.F.P. N° 14374
R.N.S. EP 004
SUB-GERENTE

Walter Rivas Altez
C.Q.F.P. N° 13854
DNI: 09238422

Walter Rivas Altez
Químico Farmacéutico
C.Q.F.P. 13864
DNI: 09238422

05 ENE 2018

Leyenda:

Según Ley 27753 del 07/05/2002 Positivo mayor de 0.5 g 0/00.

Según Ley 29439 del 18/11/2009 Positivo mayor de 0.25 g 0/00 para conductores de Transportes público y de pasajeros, mercancías o carga en general.

Anexo N° 6: Contenido de etanol del destilado de la fermentación con levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) al 1%.

N° de Dictamen Pericial	2018002000622	Fecha de Impresión	05/01/2018 11:36	N° Pag.	1 de 1
-------------------------	---------------	--------------------	------------------	---------	--------

**MINISTERIO PUBLICO**
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Sub Gerencia de Laboratorio de
Toxicología y Química Legal

SERVICIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE
ELEMENTO
DICTAMEN PERICIAL N° 2018002000622

DESCRIPCIÓN: MUESTRA 03 -FRASCO(01) DESTILADO DE FERMENTACION LEVADURA COMERCIAL(SACCHAROMYCES CEREVISIAE)
RNL/OFICIO S/N
SOLICITADO POR: PARTICULAR - JHON TRUJILLO DOMINGUEZ
FECHA DE INCIDENTE: 06/12/2017
FECHA DE RECEPCIÓN: 06/12/2017 F.CIERRE : 05/01/2018

ANALISIS SOLICITADO: DOSAJE DE ALCOHOL ETÍLICO
MUESTRA : FRASCO
Investigación Solicitada y/o Descripción de Muestra:
CON CONTENIDO

DETERMINACIÓN DE : ALCOHOL ETÍLICO

CANTIDAD:	400.08 g 0/00 ALCOHOL ETÍLICO
-----------	-------------------------------

MÉTODO: CROMATOGRAFIA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACION A LA LLAMA
OBSERVACIONES: LA MUESTRA ANALIZADA CORRESPONDE A 40.08 g %
MUESTRA AGOTADA DURANTE EL ANALISIS.
CONCLUSIONES: LA MUESTRA ANALIZADA, PRESENTA 400.08 g 0/00 DE ALCOHOL ETÍLICO

Lima, 05 de Enero de 2018


Inspector R. Galarraga
C.Q.F.P. 13058
D.N.I. 28921968


RIVAS ALTEZ WALTER
C.Q.F.P. N° 13864
DNI: 09238422
Domicilio Legal: Jr. Cangallo 818 Cercado de Lima
Walter Rivas Altez
Químico Farmacéutico
C.Q.F.P. 13864
DNI: 09238422

**MINISTERIO PUBLICO**
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
GERENCIA DE QUÍMICA LEGAL
Laboratorio de Toxicología y Química Legal

Sub-Gerente
C.Q.F.P. N° 6334
D.N.I. N° 04
SUB-GERENTE

5 ENE 2018

Leyenda:
Según Ley 27753 del 07/06/2002 Positivo mayor de 0.5 g 0/00.
Según Ley 29429 del 18/11/2009 Positivo mayor de 0.25 g 0/00 para conductores de Transportes público y de pasajeros, mercancías o carga en general.

Anexo N° 7: Contenido de etanol del destilado de la fermentación con cepa aislada de la uva al 1%.

N° de Dictamen Pericial 2018002000524

Fecha de Impresión 05/01/2018 11:38

N° Pág.

1 de 1



MINISTERIO PÚBLICO
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Sub Gerencia de Laboratorio de
Toxicología y Química Legal

SERVICIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

ELEMENTO

DICTAMEN PERICIAL N° 2018CO2000524

DESCRIPCIÓN: MUESTRA 04 - FRASCO (01), CONTENIENDO DESTILADO DE FERMENTACION CON CEPAS AISLADAS DE UVA, RML/OFICIO S/N

SOLICITADO POR: PARTICULAR - JHON TRUJILLO DOMINGUEZ

FECHA DE INCIDENTE: 06/12/2017

FECHA DE RECEPCIÓN: 06/12/2017 F.CIERRE: 05/01/2018

ANÁLISIS SOLICITADO: DOSAJE DE ALCOHOL ETÍLICO

MUESTRA: FRASCO

Investigación Solicitada y/o Descripción de Muestra:
CON CONTENIDO

DETERMINACIÓN DE: ALCOHOL ETÍLICO

CANTIDAD: 400 g 0/00 ALCOHOL ETÍLICO

MÉTODO: CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN A LA LLAMA

OBSERVACIONES: LA MUESTRA ANALIZADA CORRESPONDE A 40.00 g %
MUESTRA AGOTADA DURANTE EL ANÁLISIS.

CONCLUSIONES: LA MUESTRA ANALIZADA PRESENTA 400.00 g 0/00 DE ALCOHOL ETÍLICO

Lima, 05 de Enero de 2018


Japane R. Galbarres Pérez
C.O.F.P. 13864
D.L. 207196


RIVAS ALTEZ WALTER
C.O.F.P. N° 13864
DNI: 09238422
Domicilio Legal: Jr. Cargallo 818 Cercado de Lima
Walter Rivas Altez
Químico Farmacéutico
C.O.F.P. 13864
DNI: 09238422



MINISTERIO PÚBLICO
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
GERENCIA DE CRIMINALÍSTICA
Laboratorio de Toxicología y Química Legal


Mg. D.P. Japane R. Galbarres Pérez
C.O.F.P. N° 13864
D.L. N° 207196
SUB-GERENTE

ENE 2018

Leyenda:

Según Ley 27753 del 07/06/2002 Positivo mayor de 0.5 g 0/00.

Según Ley 29439 del 18/11/2009 Positivo mayor de 0.25 g 0/00 para conductores de Transportes público y de pasajeros, mercancías o carga en general.

ANEXO N° 8: Tabla alcoholimétrica (USP 40)

TABLA ALCOHOLIMÉTRICA

Basada en datos publicados en el National Bureau of Standards Bulletin, vol. 9, pp. 424-425 (publicación del National Institute of Standards and Technology, Instituto Nacional de Normas y Tecnología).

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Porcentaje de C.H.OH		Peso específico en el aire		Porcentaje de C.H.OH		Peso específico en el aire	
En volumen a 15,56°C	En peso	A 25°/25°	A 15,56°/15,56°	En peso	En volumen a 15,56°C	A 25°/25°	A 15,56°/15,56°
0	0,00	1,0000	1,0000	0	0,00	1,0000	1,0000
1	0,80	0,9985	0,9985	1	1,26	0,9981	0,9981
2	1,59	0,9970	0,9970	2	2,51	0,9963	0,9963
3	2,39	0,9956	0,9956	3	3,76	0,9945	0,9945
4	3,19	0,9941	0,9942	4	5,00	0,9927	0,9928
5	4,00	0,9927	0,9928	5	6,24	0,9911	0,9912
6	4,80	0,9914	0,9915	6	7,48	0,9894	0,9896
7	5,61	0,9901	0,9902	7	8,71	0,9879	0,9881
8	6,42	0,9888	0,9890	8	9,94	0,9863	0,9867
9	7,23	0,9875	0,9878	9	11,17	0,9848	0,9852
10	8,05	0,9862	0,9866	10	12,39	0,9833	0,9839
11	8,86	0,9850	0,9854	11	13,61	0,9818	0,9825
12	9,68	0,9838	0,9843	12	14,83	0,9804	0,9812
13	10,50	0,9826	0,9832	13	16,05	0,9789	0,9799
14	11,32	0,9814	0,9821	14	17,26	0,9776	0,9787
15	12,14	0,9802	0,9810	15	18,47	0,9762	0,9774
16	12,96	0,9790	0,9800	16	19,68	0,9748	0,9763
17	13,79	0,9778	0,9789	17	20,88	0,9734	0,9751
18	14,61	0,9767	0,9779	18	22,08	0,9720	0,9738
19	15,44	0,9756	0,9769	19	23,28	0,9706	0,9726
20	16,27	0,9744	0,9759	20	24,47	0,9692	0,9714
21	17,10	0,9733	0,9749	21	25,66	0,9677	0,9701
22	17,93	0,9721	0,9739	22	26,85	0,9663	0,9688
23	18,77	0,9710	0,9729	23	28,03	0,9648	0,9675
24	19,60	0,9698	0,9719	24	29,21	0,9633	0,9662
25	20,44	0,9685	0,9708	25	30,39	0,9617	0,9648
26	21,29	0,9673	0,9697	26	31,56	0,9601	0,9635
27	22,13	0,9661	0,9687	27	32,72	0,9585	0,9620
28	22,97	0,9648	0,9676	28	33,88	0,9568	0,9605
29	23,82	0,9635	0,9664	29	35,03	0,9551	0,9590
30	24,67	0,9622	0,9653	30	36,18	0,9534	0,9574
31	25,52	0,9609	0,9641	31	37,32	0,9516	0,9558
32	26,38	0,9595	0,9629	32	38,46	0,9498	0,9541
33	27,24	0,9581	0,9617	33	39,59	0,9480	0,9524
34	28,10	0,9567	0,9604	34	40,72	0,9461	0,9506
35	28,97	0,9552	0,9590	35	41,83	0,9442	0,9488
36	29,84	0,9537	0,9576	36	42,94	0,9422	0,9470
37	30,72	0,9521	0,9562	37	44,05	0,9402	0,9451
38	31,60	0,9506	0,9548	38	45,15	0,9382	0,9432
39	32,48	0,9489	0,9533	39	46,24	0,9362	0,9412
40	33,36	0,9473	0,9517	40	47,33	0,9341	0,9392
41	34,25	0,9456	0,9501	41	48,41	0,9320	0,9372
42	35,15	0,9439	0,9485	42	49,48	0,9299	0,9352
43	36,05	0,9421	0,9469	43	50,55	0,9278	0,9331
44	36,96	0,9403	0,9452	44	51,61	0,9256	0,9310
45	37,87	0,9385	0,9434	45	52,66	0,9235	0,9289
46	38,78	0,9366	0,9417	46	53,71	0,9213	0,9268
47	39,70	0,9348	0,9399	47	54,75	0,9191	0,9246
48	40,62	0,9328	0,9380	48	55,78	0,9169	0,9225
49	41,55	0,9309	0,9361	49	56,81	0,9147	0,9203
50	42,49	0,9289	0,9342	50	57,83	0,9124	0,9181
51	43,43	0,9269	0,9322	51	58,84	0,9102	0,9159
52	44,37	0,9248	0,9302	52	59,85	0,9079	0,9137

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Porcentaje de C ₂ H ₅ OH		Peso específico en el aire		Porcentaje de C ₂ H ₅ OH		Peso específico en el aire	
En volumen a 15,56°C	En peso	A 25°/25°	A 15,56°/15,56°	En peso	En volumen a 15,56°C	A 25°/25°	A 15,56°/15,56°
53	45,33	0,9228	0,9282	53	60,85	0,9056	0,9114
54	46,28	0,9207	0,9262	54	61,85	0,9033	0,9092
55	47,25	0,9185	0,9241	55	62,84	0,9010	0,9069
56	48,21	0,9164	0,9220	56	63,82	0,8987	0,9046
57	49,19	0,9142	0,9199	57	64,80	0,8964	0,9024
58	50,17	0,9120	0,9177	58	65,77	0,8941	0,9001
59	51,15	0,9098	0,9155	59	66,73	0,8918	0,8978
60	52,15	0,9076	0,9133	60	67,79	0,8895	0,8955
61	53,15	0,9053	0,9111	61	68,64	0,8871	0,8932
62	54,15	0,9030	0,9088	62	69,59	0,8848	0,8909
63	55,17	0,9006	0,9065	63	70,52	0,8824	0,8886
64	56,18	0,8983	0,9042	64	71,46	0,8801	0,8862
65	57,21	0,8959	0,9019	65	72,38	0,8777	0,8839
66	58,24	0,8936	0,8995	66	73,30	0,8753	0,8815
67	59,28	0,8911	0,8972	67	74,21	0,8729	0,8792
68	60,33	0,8887	0,8948	68	75,12	0,8706	0,8768
69	61,38	0,8862	0,8923	69	76,02	0,8682	0,8745
70	62,44	0,8837	0,8899	70	76,91	0,8658	0,8721
71	63,51	0,8812	0,8874	71	77,79	0,8634	0,8697
72	64,59	0,8787	0,8848	72	78,67	0,8609	0,8673
73	65,67	0,8761	0,8823	73	79,54	0,8585	0,8649
74	66,77	0,8735	0,8797	74	80,41	0,8561	0,8625
75	67,87	0,8709	0,8771	75	81,27	0,8537	0,8601
76	68,98	0,8682	0,8745	76	82,12	0,8512	0,8576
77	70,10	0,8655	0,8718	77	82,97	0,8488	0,8552
78	71,23	0,8628	0,8691	78	83,81	0,8463	0,8528
79	72,38	0,8600	0,8664	79	84,64	0,8439	0,8503
80	73,53	0,8572	0,8636	80	85,46	0,8414	0,8479
81	74,69	0,8544	0,8608	81	86,28	0,8389	0,8454
82	75,86	0,8516	0,8580	82	87,08	0,8364	0,8429
83	77,04	0,8487	0,8551	83	87,89	0,8339	0,8404
84	78,23	0,8458	0,8522	84	88,68	0,8314	0,8379
85	79,44	0,8428	0,8493	85	89,46	0,8288	0,8354
86	80,66	0,8397	0,8462	86	90,24	0,8263	0,8328
87	81,90	0,8367	0,8432	87	91,01	0,8237	0,8303
88	83,14	0,8335	0,8401	88	91,77	0,8211	0,8276
89	84,41	0,8303	0,8369	89	92,52	0,8184	0,8250
90	85,69	0,8271	0,8336	90	93,25	0,8158	0,8224
91	86,99	0,8237	0,8303	91	93,98	0,8131	0,8197
92	88,31	0,8202	0,8268	92	94,70	0,8104	0,8170
93	89,65	0,8167	0,8233	93	95,41	0,8076	0,8142
94	91,03	0,8130	0,8196	94	96,10	0,8048	0,8114
95	92,42	0,8092	0,8158	95	96,79	0,8020	0,8086
96	93,85	0,8053	0,8118	96	97,46	0,7992	0,8057
97	95,32	0,8011	0,8077	97	98,12	0,7962	0,8028
98	96,82	0,7968	0,8033	98	98,76	0,7932	0,7998
99	98,38	0,7921	0,7986	99	99,39	0,7902	0,7967
100	100,00	0,7871	0,7936	100	100,00	0,7871	0,7936

ANEXO N° 8: Fotografías

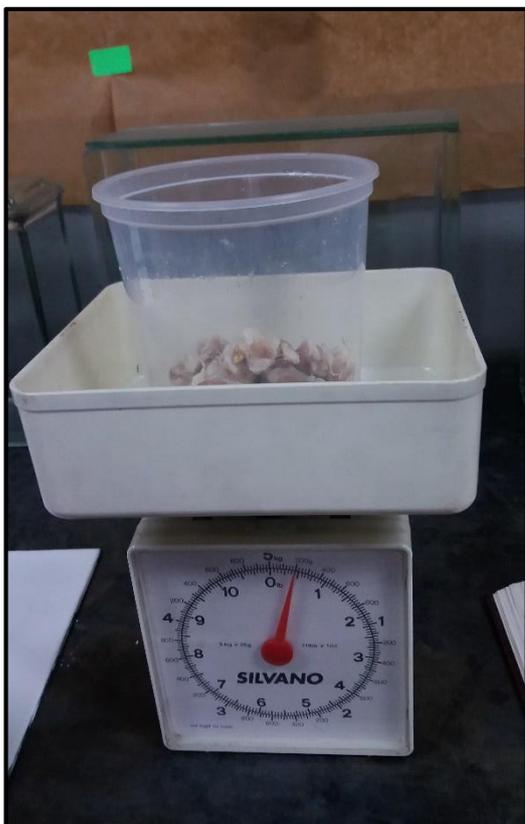
Fotografía N°1: Obtención de los frutos de cacao



Fotografía N° 2: Selección de los frutos de cacao



Fotografía N° 3: Pesaje de los frutos



Fotografía N° 4: Corte de los frutos

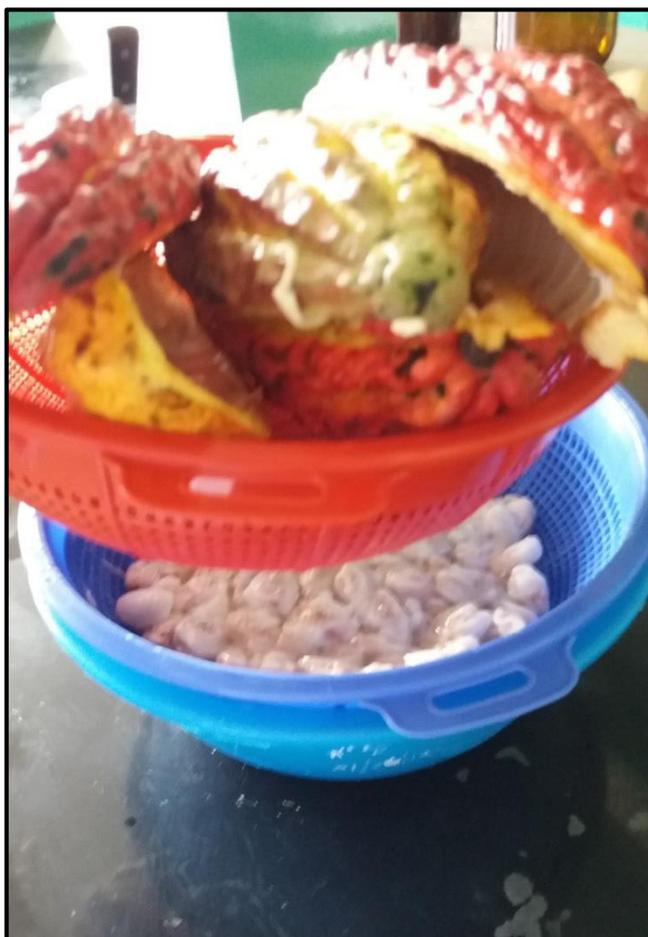




Fotografía N° 5: Separación de las semillas



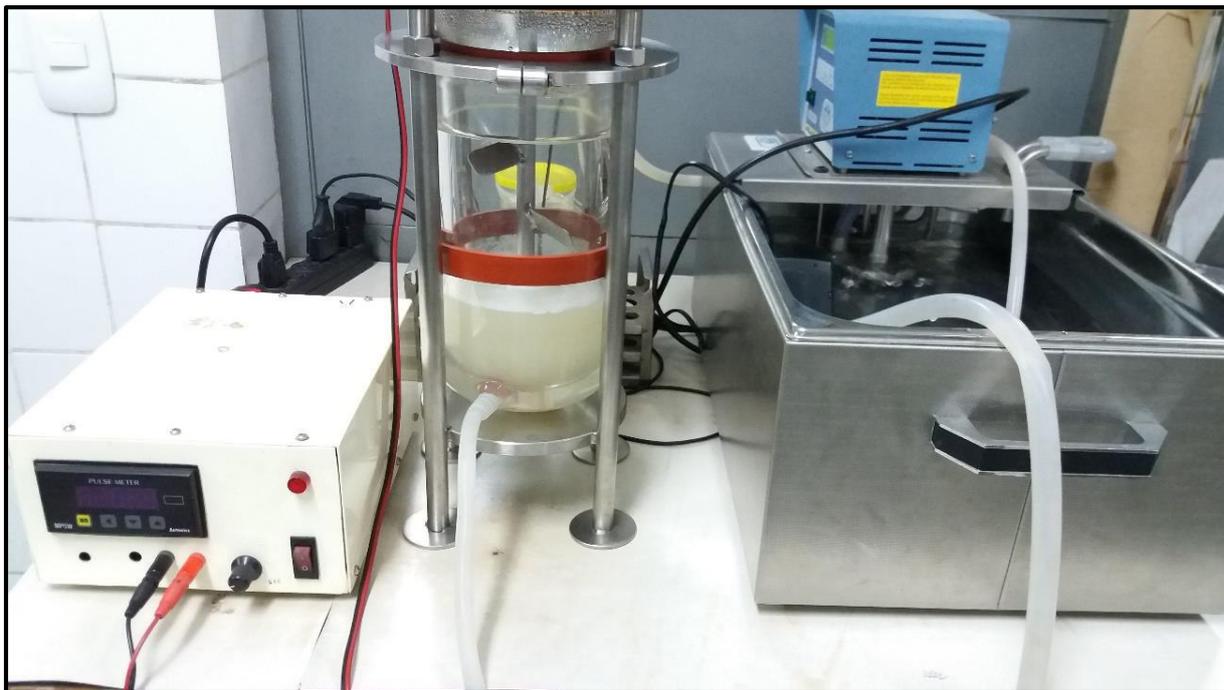
Fotografía N° 6: Extracción del exudado de la pulpa de cacao



Fotografía N° 7: Exudado de la pulpa de cacao



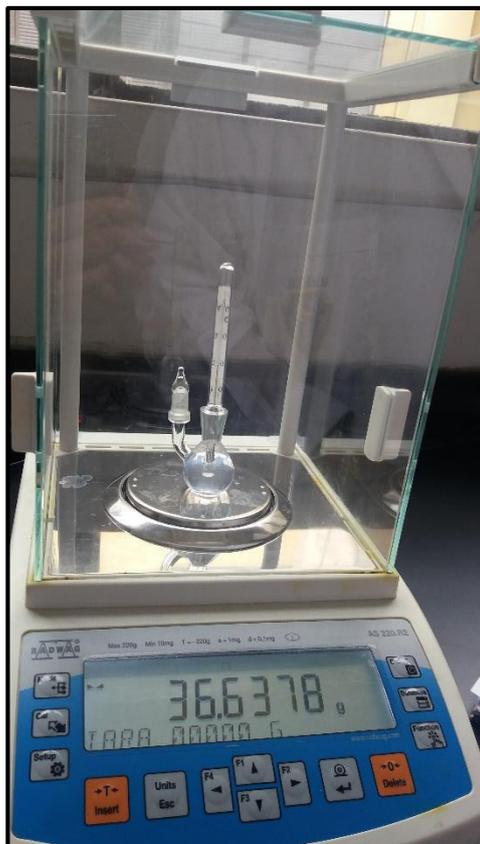
Fotografía N° 8: Equipo de fermentación (Bioreactor)



Fotografía N° 9: Equipo de destilación simple



Fotografía N° 10: Pesaje del picnómetro en la balanza analítica



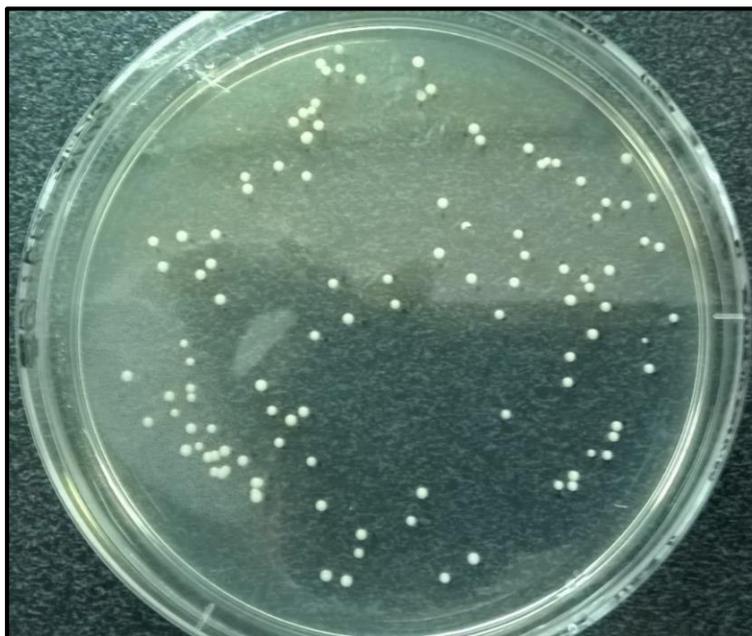
Fotografía N° 11: Ensayo cualitativo para la identificación de carbohidratos

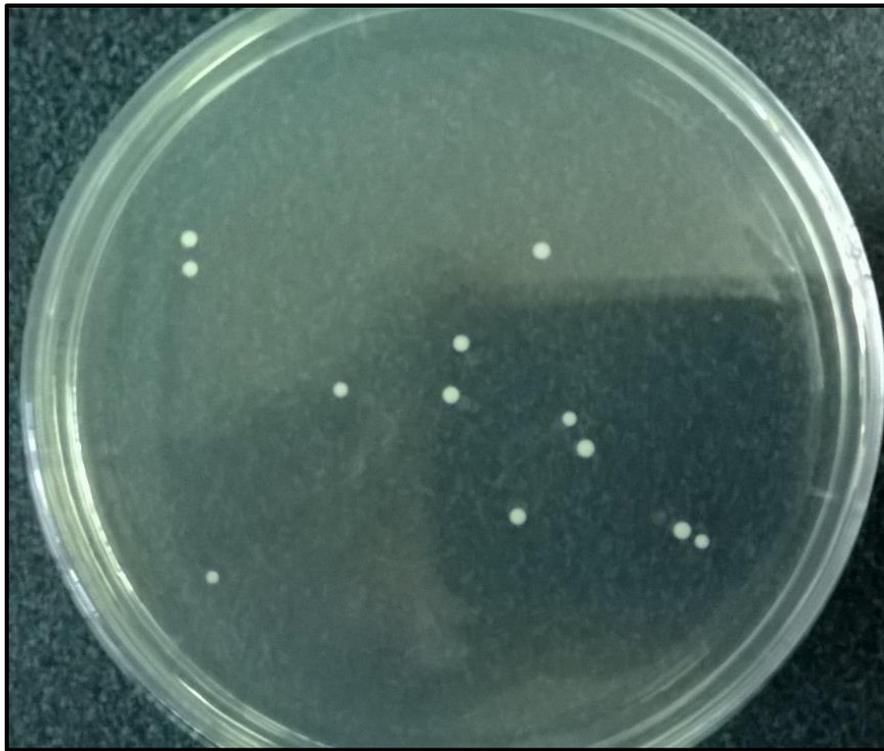


Fotografía N° 12: Cromatografía de capa delgada

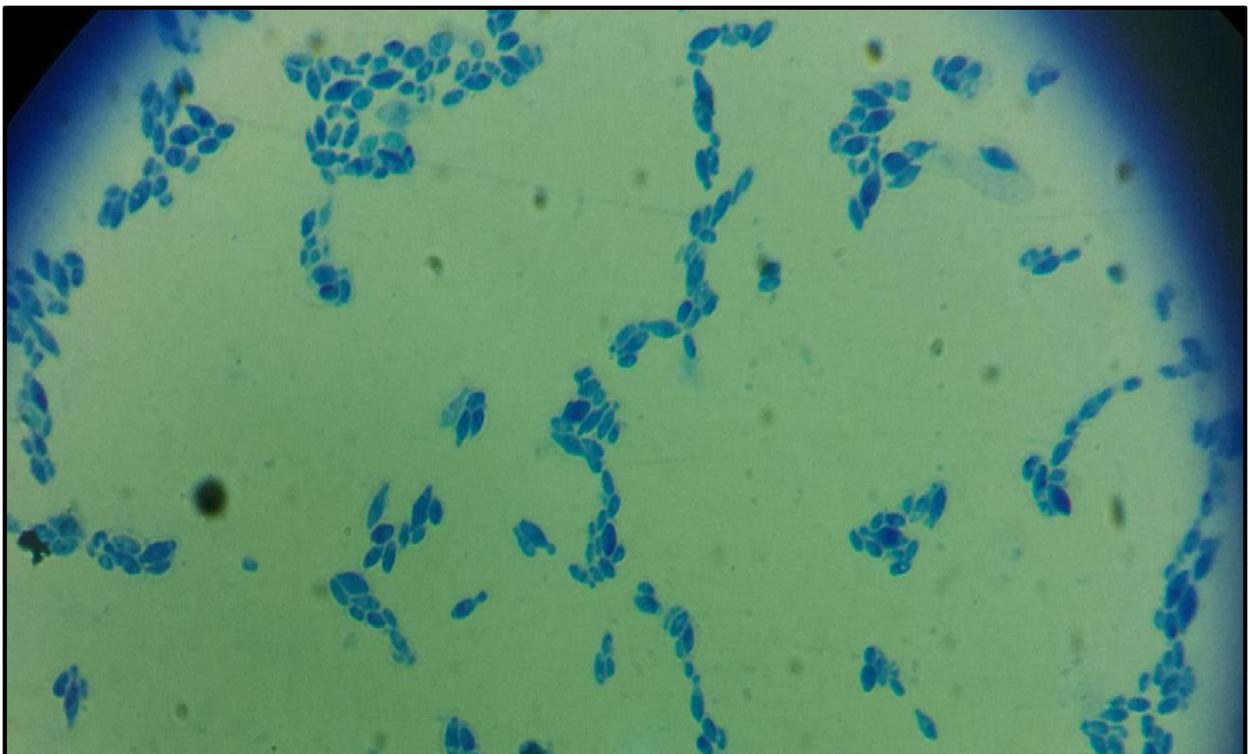


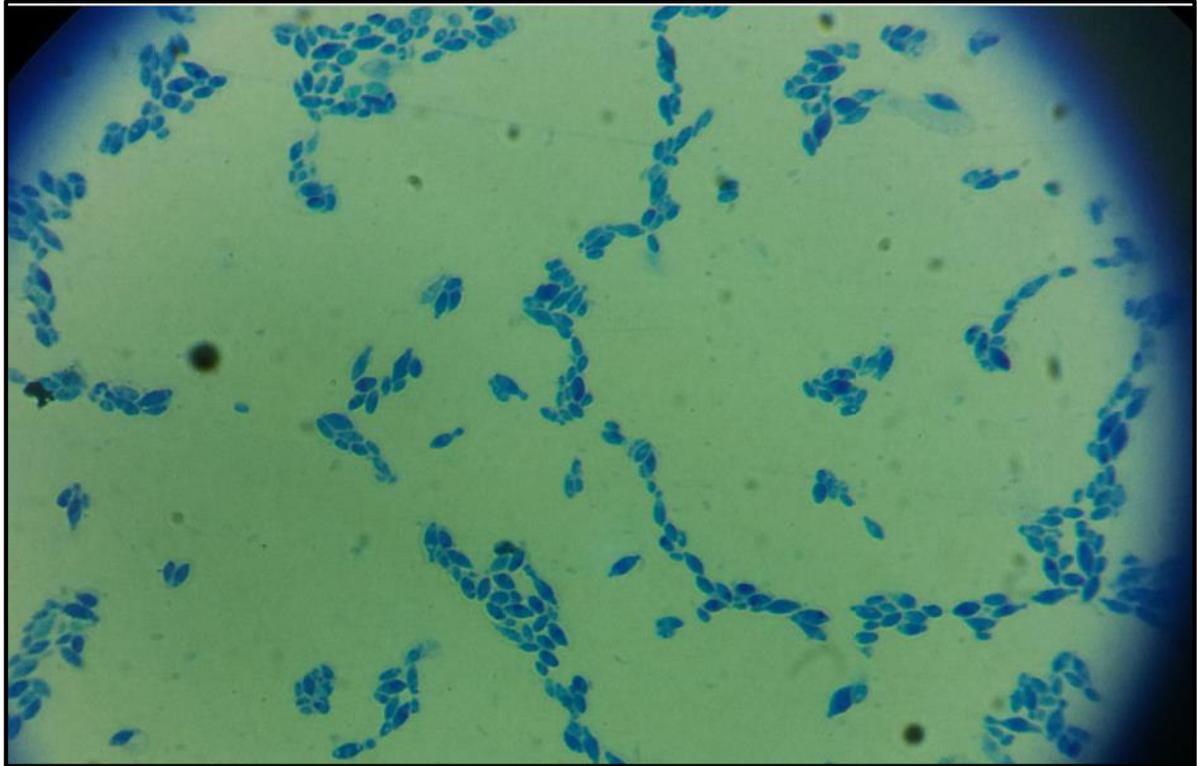
Fotografía N° 13: Colonias de la levadura obtenida del fruto de cacao





Fotografía N° 14: Visualización en el microscopio de la cepa de levadura obtenida del fruto de cacao





Fotografía N° 15: Producción de CO₂ de la cepa de levadura aislada del fruto de cacao





Fotografía N° 16: Fermentación en agar caseínpeptona rojo de fenol



