

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRA DIETARÍA A PARTIR DE
CASCARILLA DE LAS SEMILLAS TOSTADAS DE *Theobroma cacao* L. DE
UNA INDUSTRIA CHOCOLATERA COLOMBIANA.**

**Documento presentado como requisito parcial para optar al título de
QUÍMICO INDUSTRIAL**

**LUZ MARINA BAENA.
NATALIA ANDREA GARCIA CARDONA.**

**Director
Gloria Edith Guerrero Álvarez
phD Química**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2012**

NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRA DIETARÍA A PARTIR
CASCARILLA DE LAS SEMILLAS TOSTADAS DE *Theobroma cacao* L. DE LA
INDUSTRIA CHOCOLATERA COLOMBIANA.**

Presentado por:

**LUZ MARINA BAENA.
NATALIA ANDREA GARCIA CARDONA.**

**Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez
revisada la versión escrita y presenciando la sustentación oral decidimos
otorgar:**

La nota de: _____

Con la connotación: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy _____

Director: _____
Gloria Edith Guerrero Álvarez
Doctor en Ciencias Química

Jurado: _____
José Rafael Rodríguez Núñez.
Lic. Biología y Química
Esp. Microbiología Industrial
Candidato Maestría Microbiología agroindustrial

DEDICATORIA

“Haz solo lo que amas y serás feliz, y el que hace lo que ama esta benditamente condenado al éxito, que llegara cuando deba llegar, porque lo que debe ser será, y llegara naturalmente”.

Facundo Cabral.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la bendición cumplir esta gran meta en nuestras vidas

A nuestras familias por la paciencia, apoyo y financiación en estos años.

A nuestra directora Gloria E. Guerrero por brindarnos la oportunidad de realizar el trabajo de grado dentro de su grupo de investigación y por su apoyo incondicional en este tiempo.

A la Vicerrectoría de investigaciones y extensión por el financiamiento del proyecto.

A la industria chocolatera nacional por facilitarnos la cascarilla de cacao.

A nuestro evaluador Rafael Rodríguez, por su colaboración.

Al Laboratorio de Análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, por permitirnos usar sus instalaciones y equipos.

Al Laboratorio de Suelos y Foliaves de la Universidad Tecnológica de Pereira.

A todos nuestros compañeros del Grupo de investigación de Oleoquímica, y a todos nuestros amigos que estuvieron presente en el transcurso de nuestra carrera.

A la Escuela de Tecnología Química, profesores y administrativos, por los conocimientos brindados y facilitarnos el espacio propicio para el desarrollo de nuestra carrera.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----------|
| NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO | i |
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| LISTA DE TABLAS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE ANEXOS | xii |
| RESUME | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 3 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 4. OBJETIVOS | 7 |
| 4.1 GENERAL | 7 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS | 7 |
| 5. MARCO TEORICO | 8 |
| 5.1 RESEÑA HISTORICA | 8 |
| 5.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL <i>Theobroma cacao</i> L.[19-21] | 8 |
| 5.3 FENOLOGIA <i>Theobroma cacao</i> L. | 9 |
| 5.3.1 Árbol | 9 |
| 5.3.2 Hojas | 9 |
| 5.3.3 Tallo | 10 |
| 5.3.4 Flores | 10 |
| 5.3.5 Fruto | 11 |
| 5.3.6 Semillas | 12 |
| 5.4 VARIEDADES COMUNES DEL CACAO | 13 |
| 5.4.1 Criollos | 13 |
| 5.4.2 Forasteros | 13 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.4.3 | Trinitarios | 14 |
| 5.5 | PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS OBTENIDOS DE LA MANUFACTURA DEL <i>Theobroma cacao L.</i> | 14 |
| 5.6 | MERCADO Y COMERCIALIZACIÓN DE <i>Theobroma cacao L.</i> | 15 |
| 5.6.1 | Producción mundial | 15 |
| 5.6.2 | Producción en Colombia | 17 |
| 5.6.3 | Consumo Mundial | 17 |
| 5.7 | PRODUCTOS DE DESECHO DE LA MANUFACTURA DE <i>Theobroma cacao L.</i> | 19 |
| 5.7.1 | Desechos del proceso de beneficio del cacao | 19 |
| 5.7.2 | Desechos procesamiento industrial. | 20 |
| 5.8 | COMPOSICION QUÍMICA DE LAS CASCARILLAS DE <i>Theobroma cacao L.</i> Y SUS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES. | 20 |
| 5.8.1 | Pared celular de los vegetales. | 20 |
| 5.9 | FIBRA DIETARÍA | 21 |
| 5.9.1 | Componentes de la fibra dietaría | 22 |
| 5.9.1.1 | Celulosa | 22 |
| 5.9.1.2 | Hemicelulosa | 22 |
| 5.9.1.3 | Lignina | 23 |
| 5.9.1.4 | Pectinas | 23 |
| 5.9.1.5 | Mucílagos | 24 |
| 5.9.1.6 | Gomas | 24 |
| 5.9.2 | Clasificación de la fibra dietaría | 25 |
| 5.9.2.1 | Fibra soluble | 25 |
| 5.9.2.2 | Fibra insoluble | 25 |
| 5.9.3 | Importancia y usos de la fibra dietaría. | 26 |
| 5.9.4 | Obtención y caracterización de la fibra dietaría. | 26 |
| 5.9.5 | Propiedades fisiológicas de la fibra dietaría | 27 |
| 5.9.5.1 | Capacidad de retención de agua (CRA) | 27 |
| 5.9.5.2 | Capacidad de retención de aceite (CRAc) | 27 |

| | | |
|------------|---|----|
| 5.9.5.3 | Capacidad de hinchamiento (CH) | 27 |
| 5.9.5.4 | Capacidad de intercambio catiónico (CIC) | 27 |
| 5.10 | FERMENTACIÓN | 28 |
| 5.10.1 | Fermentación bacteriana | 28 |
| 5.10.1.1 | Fermentación ruminal | 29 |
| 5.10.1.2 | Productos obtenidos de la fermentación ruminal. | 30 |
| 5.10.1.2.1 | Análisis de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) | 31 |
| 5.11 | FUNDAMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS | 31 |
| 5.11.1 | Métodos químicos de análisis de fibra dietaría | 31 |
| 5.11.1.1 | Método Gravimétrico-enzimático para la determinación de fibra soluble e insoluble | 31 |
| 5.11.1.1.1 | α -amilasa Termoesmoestable | 32 |
| 5.11.1.1.2 | Proteasa | 32 |
| 5.11.1.1.3 | Amiloglucosidasa | 32 |
| 5.11.1.2 | Fibra Detergente Neutro(FDN) | 32 |
| 5.11.1.3 | Fibras Detergentes Acido(FDA) | 33 |
| 5.11.1.4 | Fermentabilidad | 33 |
| 5.11.2 | Técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia(CLAE) | 34 |
| 6. | METODOLOGIA | 35 |
| 6.1 | MATERIAL DE ANALISIS. | 35 |
| 6.1.1 | Material Vegetal. | 35 |
| 6.1.2 | Molienda. | 35 |
| 6.2 | PRETRATAMIENTO DE LA CASCARILLA DE <i>Theobroma cacao L.</i> | 36 |
| 6.2.1 | Extracción de compuesto polares de la cascarilla de cacao | 36 |
| 6.2.2 | Extracción de Lípidos. | 36 |
| 6.3 | CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CASCARILLA DE CACAO. | 36 |
| 6.3.1 | Obtención de fibra soluble (FS) y fibra insoluble (FI) | 36 |
| 6.3.1.1 | Separación de la Fibra Insoluble (FI) y la Fibra Soluble (FS) | 37 |
| 6.3.1.1.1 | Fibra Insoluble (FI) | 37 |
| 6.3.1.1.2 | Fibra Soluble (FS) | 38 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 6.3.1.2 | Determinación de cenizas | 38 |
| 6.3.1.3 | Determinación de proteínas | 39 |
| 6.3.2 | Análisis de la composición química de la fibra dietaría | 39 |
| 6.3.2.1 | Fibra Detergente Neutra (FDN) | 39 |
| 6.3.2.2 | Fibra Detergente Acida (FDA) | 40 |
| 6.3.2.2.1 | Determinación de Lignina | 40 |
| 6.4 | PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA FIBRAINSOLUBLE (FI) Y FIBRA SOLUBLE (FS). | 41 |
| 6.4.1 | Capacidad de retención de agua (CRA) | 41 |
| 6.4.2 | Capacidad de retención de aceite (CRAc) | 41 |
| 6.4.3 | Capacidad de hinchamiento (CH) | 41 |
| 6.4.4 | Capacidad de intercambio catiónico (CIC) | 41 |
| 6.5 | DEGRADABILIDAD <i>in-vitro</i> DE LA FIBRA SOLUBLE E INSOLUBLE | 41 |
| 6.5.1 | Recolección del rumen. | 41 |
| 6.5.2 | Sistema de Fermentación Ruminal <i>In-Vitro</i> | 42 |
| 6.5.2.1 | Preparación de saliva artificial | 42 |
| 6.5.2.2 | Fermentación Ruminal. | 43 |
| 6.5.2.2.1 | Análisis de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE). | 43 |
| 6.5.2.2.1.1 | Análisis cualitativo. | 43 |
| 6.5.2.2.1.2 | Análisis cuantitativo | 44 |
| 7 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 45 |
| 7.1 | PROPIEDADES FÍSICAS DE LA CASCARILA DE <i>Theobroma cacao L.</i> | 45 |
| 7.2 | CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CASCARILLA DE <i>THEOBROMA CACAO L.</i> | 46 |
| 7.2.1 | Caracterización de Fibra Insoluble (FI) y Fibra Soluble (FS) | 46 |
| 7.2.2 | Composición química de la cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 50 |
| 7.3 | PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA FIBRA DIETARÍA TOTAL DE CASCARILLA de <i>Theobroma cacao L.</i> | 53 |
| 7.4 | FERMENTACIÓN RUMINAL BACTERIANA <i>in vitro</i> | 55 |
| 7.4.1 | Caracterización del líquido ruminal. | 55 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 7.4.2 | Proceso de fermentación | 55 |
| 7.4.2.1 | Fracción de fibra soluble y fibra insoluble fermentada. | 56 |
| 7.4.2.2 | Análisis de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) | 57 |
| 7.4.2.2.1 | Análisis cualitativo de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) | 57 |
| 7.4.2.2.2 | Análisis cuantitativo | 60 |
| | CONCLUSIONES | 62 |
| | RECOMENDACIONES | 63 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 64 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Estudios relacionados con cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 4 |
| Tabla 2. Estudios relacionados con cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 5 |
| Tabla 3. Estudios relacionados con cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 6 |
| Tabla 4. Contenido de las semillas (cacao por cada 100g)[26]. | 12 |
| Tabla 5. Contenido de las semillas (cacao por cada 100g)[26]. | 13 |
| Tabla 6. Genero y especie de bacterias [51]. | 29 |
| Tabla 7. Análisis del contenido de ácido grasos volátiles por CLAE. | |
| CONDICIONES DE ANÁLISIS | 44 |
| Tabla 8. Propiedades físicas de la cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> y sus principales características. | 45 |
| Tabla 9. El contenido de FI en la cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 46 |
| Tabla 10. El contenido de FS en la cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 47 |
| Tabla 11. Contenido de Fibra Soluble (FS), Fibra Insoluble (FI) y Fibra Total (FT). | 47 |
| Tabla 12. Contenido de Fibra Detergente Neutro FDN. | 50 |
| Tabla 13. Contenido de Fibra Detergente Acido FDA. | 50 |
| Tabla 14. Porcentaje de Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Acida (FDA) | 51 |
| Tabla 15. La determinación de lignina. | 51 |
| Tabla 16. Composición química de la cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 52 |
| Tabla 17. Propiedades funcionales de fibra dietaría obtenida de la cascarilla de cacao de <i>Theobroma cacao L.</i> | 53 |
| Tabla 18. Análisis físicos del líquido ruminal y sus principales características | 55 |
| Tabla 19. Porcentaje digerido de Fibra Soluble (FS) y Fibra Insoluble (FI) de la cascarilla de cacao por fermentación ruminal. | 56 |
| Tabla 20. Ácidos grasos obtenidos en la fermentación con la fibra dietaría. | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Árbol de <i>Theobroma cacao</i> L. | 9 |
| Figura 2. Hojas de <i>Theobroma cacao</i> L. | 10 |
| Figura 3. Tallo <i>Theobroma cacao</i> L.[24] | 10 |
| Figura 4. Flores de <i>Theobroma cacao</i> L. | 11 |
| Figura 5. Frutos de <i>Theobroma cacao</i> L. | 11 |
| Figura 6. Semillas de <i>Theobroma cacao</i> L. | 12 |
| Figura 7. Cacao criollo | 13 |
| Figura 8. Cacao forastero | 13 |
| Figura 9. Cacao trinitario | 14 |
| Figura 10. Diagrama de producción de los derivados del cacao | 15 |
| Figura 11. Distribución nacional de la producción de <i>Theobroma cacao</i> L. | 16 |
| Figura 12. Principales países productores de <i>Theobroma Cacao</i> L. | 16 |
| Figura 13. Distribución nacional de la producción de <i>Theobroma cacao</i> L. | 17 |
| Figura 14. Consumo de cacao per cápita según el país. | 18 |
| Figura 15. Cascaras de <i>Theobroma cacao</i> L. arrojadas a los cultivos de cacao | 19 |
| Figura 16. Modelo de la asociación entre la celulosa, hemicelulosa y lignina en las paredes de la madera | 21 |
| Figura 17. Estructura molecular de la celulosa. | 22 |
| Figura 18. Estructura química de los componentes principales de la hemicelulosa | 23 |
| Figura 19. Estructura química del polímero formado por ácido galacturónico. | 24 |
| Figura 20. Estructura química goma guar | 24 |
| Figura 21. Diagrama sobre modo de acción de las bacterias en la fermentación | 28 |
| Figura 22. Reacción hidrólisis enzimática del almidón con α -amilasa | 32 |
| Figura 23. Reacción hidrólisis enzimática de la maltodextrina con la | 32 |
| Figura 24. Material vegetal | 35 |
| Figura 25. Molino de cuchillas | 35 |
| Figura 26. Procedimiento de hidrólisis enzimática | 37 |
| Figura 27. Filtrado después del secado. | 37 |
| Figura 28. Precipitación de la fibra soluble | 38 |
| Figura 29. Determinación de cenizas | 38 |
| Figura 30. Equipo Kjeldahl | 39 |
| Figura 31. Determinación de FDN | 40 |
| Figura 32. Determinación de FDA | 40 |
| Figura 33. Ubicación de la empresa PLANTA Y FRIGORIFICO DEL OTUN FRIGOTUN S.A.T LTDA. | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 34. Fermentación ruminal <i>in vitro</i> | 43 |
| Figura 35. Cascarillas de las semillas de <i>Theobroma cacao L.</i> | 45 |
| Figura 36. Diagrama de relación de la composición de los productos de la hidrolización enzimática de la cascarilla de cacao y su composición de Fibra Soluble (FS) y Fibra Insoluble (FI). | 48 |
| Figura 37. Esquema de comparación entre los contenidos de Fibra Insoluble (FI), Fibra Soluble (FS) y Fibra Dietaría Total (FDT) de cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> de diferentes variedades. | 49 |
| Figura 38. Líquido ruminal filtrado. | 55 |
| Figura 39. Montaje del ensayo de Fermentación <i>in vitro</i> | 56 |
| Figura 40. Cromatograma del ácido acético. | 58 |
| Figura 41. Cromatograma del ácido propiónico. | 58 |
| Figura 42. Cromatograma del ácido butírico. | 59 |
| Figura 43. Cromatograma del producto de la fermentación de fibra insoluble de la cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 59 |
| Figura 44. Cromatograma de los productos de fermentación ruminal de a fibra soluble de la cascarilla de <i>Theobroma cacao L.</i> | 60 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| ANEXO 1. Estructura química de la lignina | 72 |
| ANEXO 2. Diagrama sobre la incidencia de la fibra dietaria en la salud | 73 |
| ANEXO 3. Diagrama de digestión anaerobia en el rumen. | 73 |
| ANEXO 4. Algunas Bacterias del Rumen. | 74 |
| ANEXO 5. Diagrama de Flujo Metodología general | 75 |
| ANEXO 6. Determinación de proteínas y cenizas se obtuvieron | 76 |
| ANEXO 7. Diferentes fuentes y contenidos de Fibra Total. | 76 |
| ANEXO 8. Ecuaciones para calcular propiedades funcionales de las fibras | 77 |
| ANEXO 9. Curva de calibración del acido propiónico. | 78 |

RESUMEN

La presente investigación se obtuvo y caracterizó la fibra dietaria de la cascarilla de *Theobroma Cacao L.* procedente de una industria chocolatera colombiana, por tratamiento enzimático (α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa), la cascarilla presento contiene un 67.11% de fibra insoluble y 8,66% de fibra soluble según la caracterización química la cascarilla contiene un porcentaje de celulosa, Hemicelulosa y lignina de 17.39%, 6.38% y 32.40%. Se evaluó las propiedades funcionales (capacidad de retención de agua, capacidad de absorción de moléculas orgánicas y capacidad de hinchamiento)

Adicionalmente se llevo a cabo un ensayo de fermentación ruminal de la fibra dietaria, con rumen suministrado por la empresa PLANTA Y FRIGORÍFICO DEL OTÚN FRIGOTUN S.A.T LTDA. El ensayo se realizo en un reactor adaptado a las condiciones adecuadas de incubación (temperatura, anaerobiosis, medio de incubación). Se determino la cantidad de fibra dietaria digerida. El producto de fermentación se analizo por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Palabras claves: *Theobroma cacao L.* fibra dietaria, Fibra detergente Neutra (FDN), Fibra Detergente Acida (FDA), Fermentación ruminal, Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), ácidos grasos volátiles (AGV).

ABSTRACT

This research was obtained and characterized dietary fiber hulls of *Theobroma cacao L.* from a colombian cocoa industry, by enzymatic treatment (α -amylase, protease and amyloglucosidase) present husk containing insoluble fiber 67.11% and 8.66% soluble fiber by chemical characterization husk contains a percentage of cellulose, hemicellulose and lignin 17.39%, 6.38% and 32.40%. We evaluated the functional proprieties (water holding capacity, absorption capacity for organic molecules and swellability)

Additionally a ruminal fermentation trial of dietary fiber was conducted with rumen supplied by the company PLANTA Y FRIGORÍFICO DEL OTUN FRIGOTUN S.A.T LTDA. The trial was conducted in a reactor adapted to the appropriate incubation conditions (temperature, anaerobic incubation medium). We determined the amount of undigested dietary fiber. The fermentation product was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

Keywords: *Theobroma cacao L.* dietary fiber, Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), Ruminal fermentation, high performance liquid chromatography (HPLC), volatile fatty acid (VFA).

1. INTRODUCCION

El *Theobroma cacao L.* pertenece a la familia de las Esterculiáceas. Se clasifica en dos grandes grupos: El Cacao Fino y de Aroma, al cual pertenecen las variedades conocidas como: *Criollo y Trinitario y*; El Cacao Común, Básico o a Granel, principalmente con la variedad conocida como *Forastero*. Más del 90% del cacao producido cada año a nivel mundial puede considerarse como cacao básico o a granel, y procede en su mayoría de África y Brasil, con la variedad forastero. El cacao fino y de aroma tiene características distintivas de aroma y sabor que le dan precisamente ese nombre, y es el preferido por los fabricantes de chocolates; no obstante apenas representa el 5% de la producción mundial. El cacao *criollo* se cultiva desde México hasta Brasil y en Indonesia, Papúa Nueva Guinea y Sri Lanka; el *forastero*, de cuyas variedades se produce el cacao básico para generar híbridos de mayor productividad y calidad, se cultiva en las costas de Golfo de Guinea en África Occidental y en América Central y Suramérica; y el *trinitario*, cruce entre criollo y forastero, se cultiva en las Antillas [1, 2].

Colombia es el tercer país productor de cacao en América Latina, luego de Brasil y Ecuador. Según el DANE, en 2006 las exportaciones de la cadena cacao-chocolatería sumaron más de 56 millones de dólares [3].

El cacao en Colombia ocupa el octavo lugar entre los productos agrícolas más comerciales para el país, con un área cosechada de 93.492 hectáreas o 2.7% del total agrícola. Las producciones cacaoteras en el país se han caracterizado por su bajo nivel tecnológico, en donde sólo se realiza el control de malezas, poda y recolección de la cosecha. El cacao se produce en casi todos los departamentos del país, pero se concentra principalmente en Santander con el 46%, Huila, Norte de Santander, Arauca, Tolima, Nariño, Antioquia, Cundinamarca, Caldas y Cesar los cuales en conjunto representan el 47% del total. Estos diez departamentos producen el 93% del cacao de Colombia [1].

A nivel nacional e internacional existen dos tipos de procesadora de cacao: el prensado y molienda, que permite la elaboración o producción de licor o pasta, manteca, tortas y cacao en polvo; y la fabricación de chocolates. las primeras procesan cerca de las dos terceras partes del cacao que se producen en el mundo y las empresas fabricantes de chocolates adquieren buena parte de los productos intermedios obtenidos por las industrias procesadoras de cacao. El grano de cacao es la materia prima para la industria confitera productora de chocolates, de cosméticos y farmacéuticos. En Colombia, la cadena productiva del

cacao comprende tres tipos de productos: 1) primarios: cacao en grano; 2) Intermediarios: manteca, polvo y pasta de cacao; 3) finales: chocolate para mesa y confites [4].

La cascarilla de cacao representa el mayor subproducto de la industria chocolatera tanto en Colombia como a nivel mundial. Actualmente han aumentado estudios relacionados para este tipo de residuos y su posible utilización, debido a que estos representan un importante componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo, constituyendo una buena fuente de recursos renovables y energía. Internacionalmente se viene desarrollando posibles usos de la cascarilla de cacao, como fuente de fertilizantes de suelos[5], alimento para aves y animales[6], fuente de pectinas y gomas[7], elaboración de carbón activado[8]y obtención de fibra dietaría[9-11]. Sin embargo en Colombia, es totalmente desaprovechada y son pocos los estudios que se tiene al respecto. En la Universidad Tecnológica de Pereira, Surge la necesidad de llevar a cabo un proceso investigativo que permite aprovechar la presencia de agentes antibacterianos en los extractos de la cascarilla de cacao [12] encontrándose una buena potencialidad de la actividad antibacteriana y de la concentración mínima inhibitoria, de los extractos indicando que tienen una gran capacidad para disminuir el crecimiento de algunos microorganismos patógenos. Con el fin de continuar este estudio se planteo como objetivo el estudio de la cascarilla como una potencial fuente de fibra dietaría.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El fruto del cacao botánicamente es una baya que contiene aproximadamente de treinta a cincuenta semillas, incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa (cascarilla) [13]. Estas representan por lo menos un 10% del total del fruto y es desechado en su mayoría por las industrias productoras de las diferentes aplicaciones del cacao como son: la fabricación de chocolates, manteca entre otros. Se le ha tratado de encontrar un uso a esta cascarilla en la obtención de pectinas, en alimentos concentrados para animales [7, 14], sin embargo, en Colombia no se aprovecha este subproducto y se plantea ¿Será posible aprovechar los residuos de la extracción de la cascarilla del cacao, en la obtención de fibra dietaria, o fibras que se puedan emplear en la industria como materia prima en la elaboración de diferentes productos, con el fin de dar un valor agregado a este tipo de residuos?

3. ANTECEDENTES

Los alimentos funcionales, como la fibra dietaria representan una gama de alimentos que además de actuar como nutrientes, pueden afectar positivamente funciones biológicas específicas, siendo los forrajes, frutos y hortalizas las principales fuentes de fibra dietaria. La cascarilla de cacao al ser el mayor subproducto de la industria [10, 15], ha generado diferentes investigaciones para su potencial uso como fibra dietaria, en tabla se relacionan algunos de los estudios realizados para cascarilla de cacao.

Tabla 1. Estudios relacionados con cascarilla de *Theobroma cacao L.*

| País | Estudio | Resultados | Método de análisis |
|-----------------|--|---|--------------------------------|
| Ecuador 2011 | Modificación enzimática de la fibra dietaria de la cáscara del cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>) variedad Complejo nacional por trinitario | El tipo de enzima, volumen y sitio si afecta el balance de FDI/FDS. | Método enzimático-gravimétrico |
| Ecuador 2010 | Identificación de fibra dietaria en residuos de Cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>) Variedad compleja nacional por Trinitario | La cáscara y la testa por su contenido son buenas fuentes de fibra dietaria insoluble, mientras que el mucilago es una buena fuente de fibra dietaria soluble. Los valores que presenta la fibra de la cáscara y la testa de cacao en las propiedades funcionales como capacidad de retención de agua (WRC) y capacidad de adsorción de grasa (FAC), son inferiores a los rangos establecidos para valorar la fibra como de alta WRC y FAC. | método enzimático-gravimétrico |
| Ghana 2009 | Enzyme cocktail for enhancing poultry utilization of cocoa pod husk | En este estudio <i>in-vitro</i> se muestra que la adición generalmente de una mezcla eficaz de enzimas exógenas extracelulares comerciales fibrolíticas mejora la digestión de la pared celular de cascarilla de cacao, y por lo tanto tiene el potencial de mejorar la digestión de las aves | Método enzimático |

Tabla 2. Estudios relacionados con cascarilla de *Theobroma cacao* L.

| País | Estudio | Resultados | Método de análisis |
|----------------|---|--|--|
| España 2008 | Hypolipidemic Effect in Cholesterol-Fed Rats of a Soluble Fiber-Rich Product Obtained from Cocoa Husks | Los ensayos en ratas demostraron, que la cascarilla gracias a su contenido de fibra dietaría tiene un potencial uso como suplemento alimenticio, el cual puede contribuir al control de numerosas enfermedades. | método enzimático-gravimétrico de la AOAC, ensayos clínicos <i>in-vivo</i> |
| España 2006 | A Controlled, Randomized, Double-Blind Trial to Evaluate the Effect of a Supplement of Cocoa Husk That Is Rich in Dietary Fiber on Colonic Transit in Constipated | Este estudio ha demostrado que la administración de un suplemento de cáscara de cacao rico en fibra dietaría y relacionado con procedimientos normalizados es beneficioso, para los pacientes pediátricos que tienen idiopática crónica estreñimiento. Estos beneficios parecen ser más evidente en pacientes pediátricos con tránsito colónico lento. | Ensayos clínicos <i>in-vivo</i> |
| España 2006 | Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad Antioxidante en suero de animales de experimentación | Teniendo en cuenta los análisis realizados sobre el producto de fibra de cacao, tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> , se puede concluir que éste podría ser utilizado como fuente dietética de fibra (principalmente insoluble pero también de fibra soluble) y de compuestos antioxidantes (epicatequina). | método enzimático-gravimétrico de la AOAC |
| Cuba 2002 | Fermentación sólida de la cáscara de cacao Por <i>pleurotus</i> sp | En la caracterización de las cáscaras de cacao utilizadas como sustratos, se observo que poseen los requerimientos nutricionales necesarios para la tecnología de cultivo de las setas comestibles del género <i>Pleurotus</i> spp. | Microbiológico |

Tabla 3. Estudios relacionados con cascarilla de *Theobroma cacao* L.

| País | Estudio | Resultados | Método de análisis |
|-------------------|---|--|---------------------------------|
| Venezuela 2001 | Efecto de diferentes residuos vegetales en la compostación De cáscaras de cacao | Los resultados obtenidos en este estudio permiten señalar que el uso de restos de cosecha de cacao para la producción de bioabono, es posible mejorarla utilizando materiales orgánicos presentes en las unidades de producción de cacao tales como el pseudotallo de plátano, follaje de árnica y estiércol de ganado bovino. | Compostación |
| Ecuador 2000 | Evaluación de 2 Dietas Experimentales con Diferentes Niveles de Cascarilla de Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en las Fases de Crecimiento y Acabado de Cuyes (<i>Cavia porcellus</i> L.) de Raza Andina | Los resultados obtenidos inducen a concluir que es necesario realizar un estudio más profundo, en estas como en todas las fases del ciclo de vida del cuy, para así poder incrementar alternativas no tradicionales como insumos en la alimentación de animales de Consumo masivo. | Ensayos Clínicos <i>in vivo</i> |
| Brasil 2012 | Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (<i>Theobroma cacao</i> L.) with citric acid | La extracción de pectinas de la cascarilla de cacao mediante ácido cítrico, es efectiva lo que puede ayudar a darle un valor a este subproducto | Caracterización y extracción |

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Obtener y caracterizar la fibra del residuo del extracto de la cascarilla de cacao, procedente de la industria chocolatera colombiana. Con el fin de proponer un potencial uso para su aprovechamiento por la industria en general.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener la fibra de la cascarilla de cacao mediante procesos de hidrólisis enzimática.
- Caracterizar química y físicamente la fibra de la cascarilla de cacao con el fin de dar un valor agregado al subproducto y contribuir al aprovechamiento integral del fruto.
- Definir criterios que permitan establecer alternativas para la aplicación o utilización de la fibra dietaria a partir de los residuos de la cascarilla de cacao

5. MARCO TEORICO

5.1 RESEÑA HISTORICA

Existen muchas hipótesis sobre el origen del cacao; en el 2002 se encontró que el cacao se origino en la cuenca alta de rio Amazonas (entre las riveras altas de los ríos Napo, Caquetá y Putumayo) más tarde se introdujo a Centroamérica, aunque este sea considerado por los historiadores como el primer centro de domesticación y cultivo de este [16].

Cuando los primeros colonizadores llegaron a América, el cacao era cultivado por los indígenas, principalmente por los aztecas y mayas en Centroamérica. Según los historiadores, fue nombrado por los indígenas como el **Cacahualt**, siendo considerado como árbol sagrado [16].

En el siglo XVI, el cacao se dispersó a otros continentes, cuando Hernando Cortés reportó el hallazgo de una bebida amarga usada por los aztecas y envió las semillas y recetas a Europa. Durante el siglo XIX, las recetas originales se refinaron, y se desarrollaron las tecnologías que facilitaron el tostado y molienda de los granos de cacao, lo que permitió el origen y el desarrollo de la industria del chocolate y se popularizó su consumo en el mundo. El cultivo de *Theobroma cacao* en otros continentes inició entre los siglos XVIII y XIX. En 1900, el 80% de la producción se daba en el continente americano, mientras en el siglo XXI, América se convierte en el continente con la menor producción de cacao, contrastando con el continente africano, donde se encuentra 78% de la producción mundial [17].

Más de un milenio después de su descubrimiento, el chocolate es ahora un gran negocio. Solo Estados Unidos, el consumidor más grande del mundo, consume entre 1 a 1.4 millones de toneladas de chocolate al año, y el intercambio global de confitería, del cual el chocolate tiene un papel principal, está estimado en 80 billones de dólares al año [18].

5.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL *Theobroma cacao* L.[19-21]

| | |
|---------|---------------------------|
| Reino | Plantae |
| Phylum | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Malvales |
| Familia | Sterculiaceae |
| Género | <i>Theobroma</i> |
| Especie | <i>Theobroma cacao</i> L. |

5.3 FENOLOGIA *Theobroma cacao* L.

Existen diferentes plantas tropicales pertenecientes al género *Theobroma cacao* se han reportado aproximadamente 22 especies, aunque solo una (*Theobroma cacao* L., familia *Sterculiaceae*) presenta importante significancia comercial, por tal motivo ha sido estudiada con más detenimiento [12, 22, 23]. Es un cultivo permanente con periodo de vida de aproximadamente 40 años; crece entre los límites de 26° latitud norte y 26° latitud sur. Temperatura media entre 25° y 29°C, son sensibles a temperaturas mayores a 32°C. Se desarrolla en suelos no inundables, fértiles, ricos en materia orgánica, profundos y con buen drenaje [7, 22, 23].

5.3.1 Árbol

Theobroma cacao L. es un arbusto entre 2 y 7 metros de altura denominado cacao o cacaotero (ver figura 1), en forma silvestre puede crecer hasta 20 metros de altura; este árbol posee una copa, baja, densa y extendida [7, 22, 23].

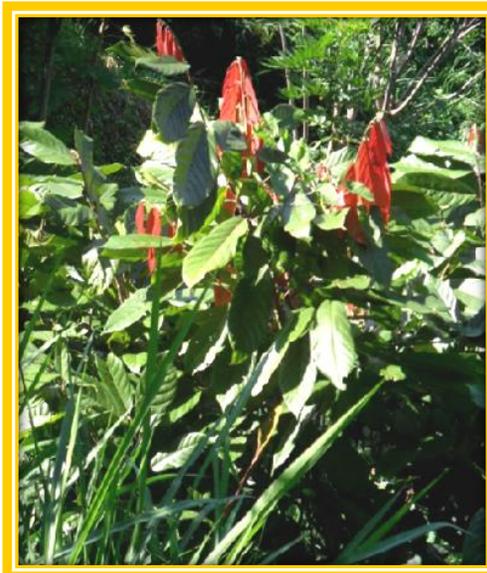


Figura 1. Árbol de *Theobroma cacao* L.

Fuente: autoras.

5.3.2 Hojas

Son grandes (ver figura 2), alternas, elípticas u oblondas entre 15-50 centímetros de largo aproximadamente y entre 4-15 centímetros de ancho [7, 22, 23].



Figura 2. Hojas de *Theobroma cacao* L.

Fuente: autoras

5.3.3 Tallo

Crece en forma dimorfica, con brotes ortotrópicos (Ver figura 3). Ramas plagiotrópicas o en abanico; su corteza externa es de color castaño oscuro, áspera agrietada y delgada[7, 22, 23].

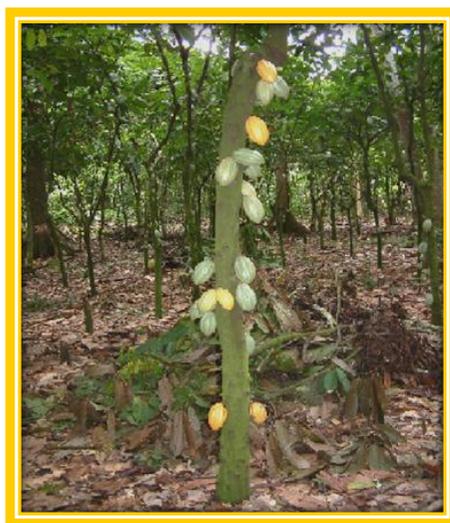


Figura 3. Tallo *Theobroma cacao* L.[24]

5.3.4 Flores

Crece a lo largo del tronco y de las ramas sostenidas por un pedicelo de 1-3cm, son pequeñas, de color rosado, blanco y púrpura comúnmente (ver figura 4). La polinización del cultivo es entomófila destacando la presencia de pequeñas moscas de varias especies del género *Forcipomyia* [7, 22, 23, 25].

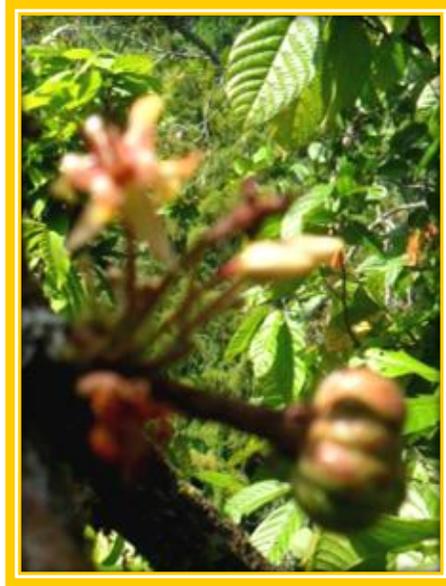


Figura 4. Flores de *Theobroma cacao* L.
Fuente: autoras.

5.3.5 Fruto

Es una baya grande comúnmente denominada "mazorca" (ver figura 5), carnososa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial e incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa o cascarilla [7, 22, 23].



Figura 5. Frutos de *Theobroma cacao* L.
Fuente: autoras

5.3.6 Semillas

Como se aprecia en la figura 6, son grandes del tamaño de una almendra, color chocolate o púrpúreo, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo. No tiene albumen, están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco, de sabor dulce y acidulado. Todo el volumen de la semilla en el interior está prácticamente ocupado por los 2 cotiledones del embrión. Se les llama vulgarmente "habas" o "granos" de cacao. Ricas en almidón, en proteínas, en materia grasa, lo cual les confiere un valor nutritivo real (Tabla 4 y 5) [7, 22, 23].

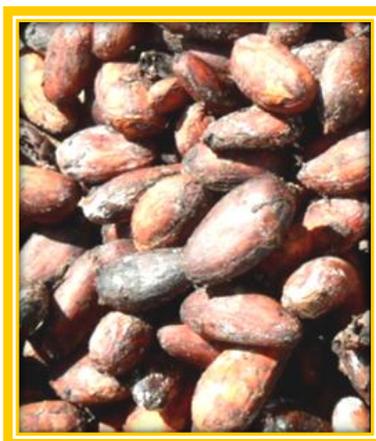


Figura 6. Semillas de *Theobroma cacao* L.

Fuente: autoras

Tabla 4. Contenido de las semillas (cacao por cada 100g)[26].

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

Tabla 5. Contenido de las semillas (cacao por cada 100g)[26].

| | |
|-------------------------|-------------|
| Acidopantotenico | 1.35 mg |
| Histidina | 0.04-0.08 g |
| Arginina | 0.03-0.08 g |
| Treonina | 0.14-0.84 g |
| Serina | 0.88-1.99 g |
| Acido glutámico | 1.02-1.77 g |
| Prolina | 0.72-1.97 g |
| Glicina | 0.09-0.35 g |
| Alanina | 1.04-3.61 g |
| Valina | 0.57-2.60 g |
| Lisina | 0.08-0.56 g |
| Leucina | 0.45-4.75 g |
| Isoleucina | 0.56-1.68 g |
| Tirosina | 0.57-1.27 |
| Fenilalanina | 0.56-3.36 |

5.4 VARIEDADES COMUNES DEL CACAO

5.4.1 Criollos

Es originario de Centroamérica, Colombia y Venezuela. Se distingue por tener frutos de cáscara suave, de esta variedad se produce el cacao fino o de mejor calidad [2, 27]. Este tipo de cacao posee un cotiledón de color entre marfil pardusco y castaño muy claro, con un olor de cacao dulce unido a un aroma delicado característico [28].



Figura 7. Cacao criollo
Fuente: Autoras

Forasteros

Es originario de América del sur y es el más cultivado en las regiones cacaoteras de África y Brasil. Se distingue porque tiene frutos de cáscara dura y más o menos lisa. Sus semillas o almendras son de color morado y sabor amargo [2, 27].

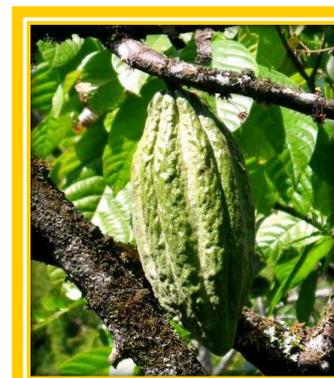


Figura 8. Cacao forastero
Fuente: Autoras

5.4.2 Trinitarios

Surge del cruce del cacao Criollo y Forastero. Las mazorcas suelen ser de muchas formas y colores; las semillas son más grandes que las del cacao criollo y forastero; las plantas son fuertes, de tronco grueso y hojas grandes. En la actualidad la mayoría de los cacaotales que existen en el mundo son trinitarios [2, 27].



Figura 9. Cacao trinitario
Fuente: Autoras

5.5 PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS OBTENIDOS DE LA MANUFACTURA DEL *Theobroma cacao* L.

En el pasado, tal como en la actualidad; el cacao ha sido apreciado mundialmente no solo por su magnífico sabor, sino también por sus beneficios nutritivos, esta importancia lo ha convertido en un producto de lujo; que debido a sus diferentes presentaciones, puede ser accesible a todo tipo de público.

Del cacaotero se obtiene un fruto, el cual es una baya elipsoidal, ovoide, fusiforme, oblonga o esférica, que contiene de 20 a 40 semillas, las cuales sufren un proceso, de fermentación de dos etapas: anaerobio (etapa de hidrólisis o fase alcohólica) y aerobio (etapa de oxidación), después de ser retiradas del fruto. Luego son secadas y almacenadas en silos, posteriormente son llevadas a la industria donde sufren un proceso de transformación (figura 10). Las semillas son la fuente de cacao comercial (chocolate y manteca de cacao). La transformación industrial de las semillas consta de una variedad de operaciones, que persiguen la obtención de diferentes tipos de productos. En este sentido, existen dos clases de procesadores del grano de cacao: aquellos que producen productos para la confitería, la fabricación de chocolates y otros subproductos derivados del cacao, y los que se destinan a constituir materia prima para la industria alimentaria y farmacéutica. Otra manera de catalogarlos es como: industriales molineros y fabricantes de chocolate. En el caso específico de la molinera, ésta se dedica a la elaboración únicamente del licor de cacao, manteca de cacao, torta y polvo de cacao [17, 24, 29].

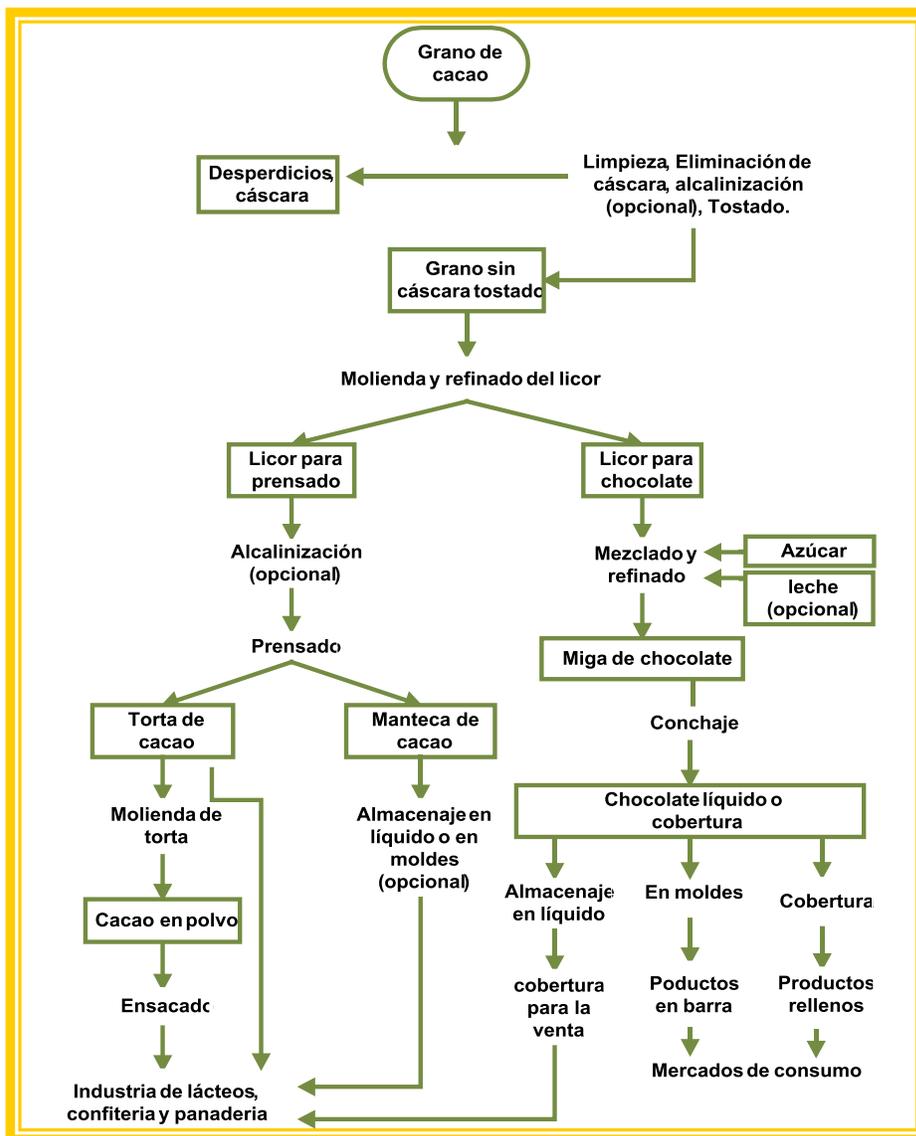


Figura 10. Diagrama de producción de los derivados del cacao

5.6 MERCADO Y COMERCIALIZACIÓN DE *Theobroma cacao* L.

5.6.1 Producción mundial

El cacao es producido por un buen número de países en el mundo, aunque se concentra especialmente en las zonas tropicales. En efecto, su cultivo predomina especialmente en África del Oeste, Asia, Sur y Centro América. Como se observa en la figura 11 la producción mundial se centra en los ocho países principales productores, cuya producción representa el 90% del total mundial. En el mundo, los niveles anuales de producción se han desviado de forma considerable

respecto al valor de tendencia, debido principalmente a la influencia de factores meteorológicos [30].

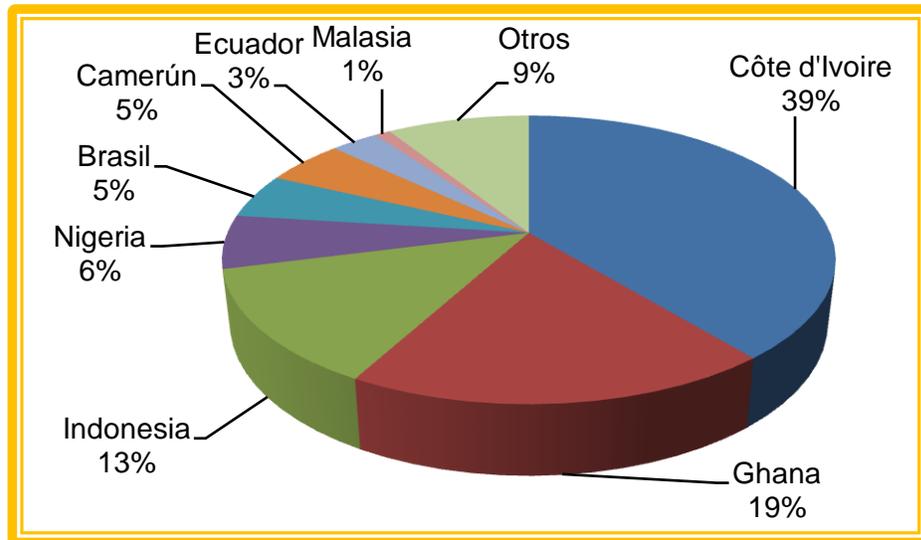


Figura 11. Distribución nacional de la producción de *Theobroma cacao L.* [30]

La figura 12 muestra la distribución mundial de los países productores de cacao, destacándose los países de América del Sur, América Central, México, el Caribe, África, Asia y Oceanía; los cuales cuentan con tierras de bosques húmedos tropicales [19].



Figura 12. Principales países productores de *Theobroma Cacao L.* [19].

5.6.2 Producción en Colombia

Colombia aporta entre 1,5% y 12,4% a la producción mundial y regional, respectivamente. Según (FAO, 2009). En Colombia el cacao se cultiva en 30 departamentos, en general por pequeños campesinos con un área promedio de cultivo de 3.3 hectáreas [31]. El departamento que tradicionalmente ha concentrado la mayor producción de cacao es Santander con el 46,2% de participación en el total. Le siguen en importancia con sensiblemente menor participación: Norte de Santander, Huila, Arauca, Tolima, Nariño, Antioquia y Cundinamarca, los cuales en conjunto representan el 45,4% del total. En el Eje Cafetero los departamentos productores de cacao son Caldas y Risaralda con un 1.35 y 0.38% de la producción nacional anual [30]. En la figura 13, se puede apreciar, la distribución departamental de cacao, del cual hubo una producción de 30356 toneladas en el año 2004 [12, 32, 33].

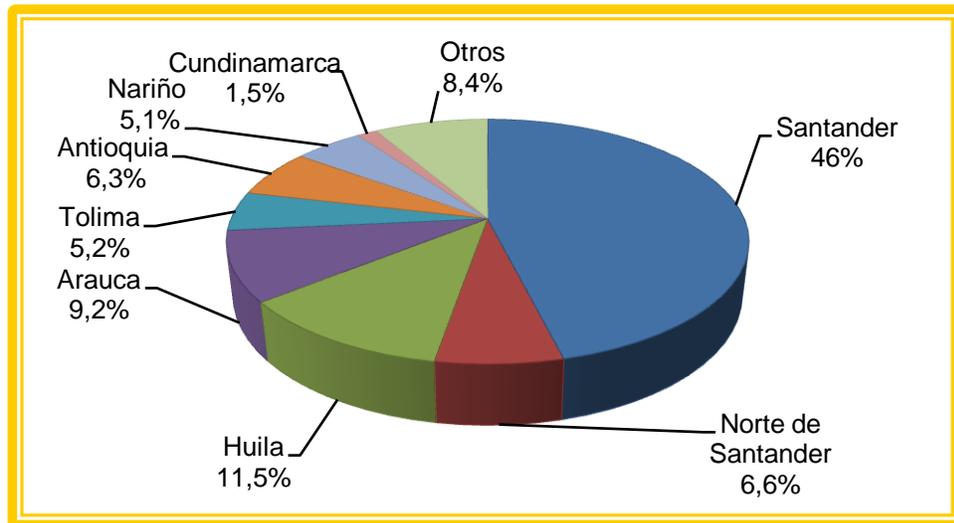


Figura 13. Distribución nacional de la producción de *Theobroma cacao L.* [12].

5.6.3 Consumo Mundial

Como se observa en la figura 14, los más grandes consumidores de cacao y de chocolate son los europeos y los estadounidenses, cada país tiene sus propias preferencias por los diferentes productos. Por tal motivo, a los países de Europa del este se les considera un importante mercado emergente, con un futuro por predecir. El mercado nacional, que tiene actualmente el sector del cacao colombiano, tiene como objetivo señalar las oportunidades que pueden presentar los diferentes sectores productivos de cacao en el país, así como los posibles

clientes a los que se puede enfocar la estrategia comercial del territorio y sus competidores.

Para ello, instituciones como Corpoica y Fedecacao vienen realizando amplios estudios de mercado para la comercialización, estudios de mejoramiento, análisis de suelos y apoyos técnicos y económicos de a los diferentes productores de cacao. El análisis de información a partir de bases de datos de comercio exterior, permiten dar conocimiento del mercado internacional teniendo en cuenta los antecedentes de importación y exportación ya incursionados en el mercado nacional para considerar futuros mercados a nivel exportación [18, 27, 32].

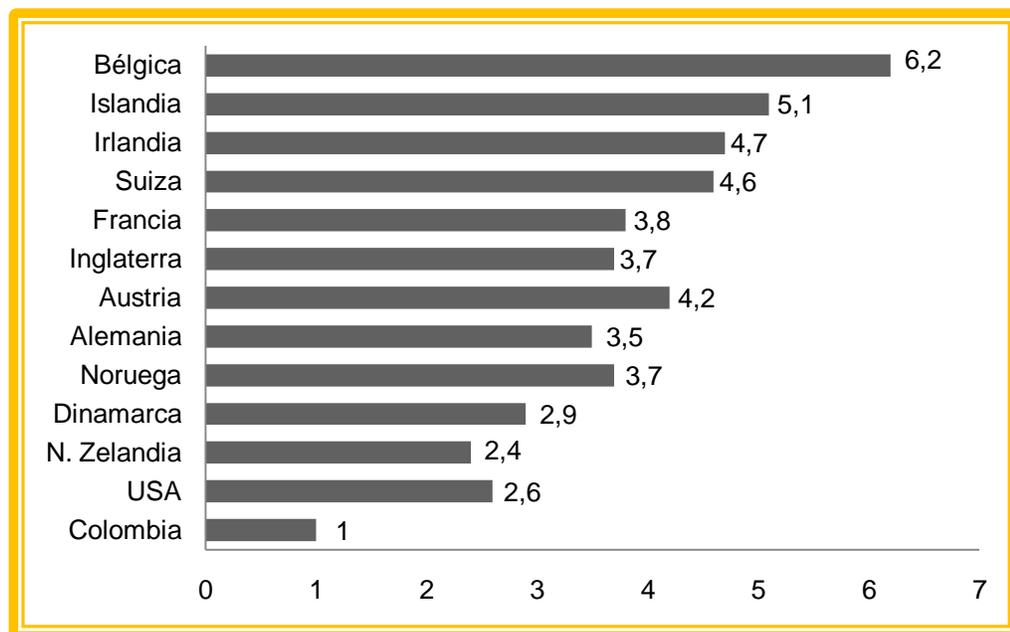


Figura 14. Consumo de cacao per cápita según el país [30]

Para consolidar el estudio de mercado se parte de entender que la producción de cacao en grano y todos sus subproductos y transformaciones se encuentran registrados ante el Arancel de Aduanas de Colombia. Esta clasificación comprende productos como:

- i) Cacao en grano crudo o tostado,
- ii) Residuos,
- iii) Pasta de cacao,
- iv) Manteca de cacao,
- v) Cacao en polvo, y
- vi) Chocolate y sus demás preparaciones.

El sector colombiano de cacao y sus preparaciones exportó en el año 2010 cerca de 73,9 millones de dólares FOB, registrando así un incremento del 11,5% con respecto al año inmediatamente anterior. Esta tendencia creciente se mantuvo durante lo corrido del presenta año, ya que las exportaciones a agosto del 2011 ascienden a 53,2 millones de dólares FOB [18, 32].

5.7 PRODUCTOS DE DESECHO DE LA MANUFACTURA DE *Theobroma cacao L.*

En el procesamiento industrial del *Theobroma cacao L.*, se obtienen desechos en cada una de las etapas para la fabricación de los derivados del cacao.

5.7.1 Desechos del proceso de beneficio del cacao

Cascara: corresponde al 90% del fruto; siendo este el principal desecho en la producción de cacao. Las cascaras de cacao representan un grave problema para los cultivador, ya que al ser usado como abono sin compostar (figura 15), se convierten en una fuente significativa de enfermedades causada por varias especies del género *Phytophthora* como la mazorca negra. Aunque las cascaras de cacao se han tratado de utilizar para la alimentación de animales, su uso ha sido limitado ya que los altos contenidos de alcaloides presentes en las cascaras restringen el consumo en animales, debido a que sus sistemas digestivos se ven impedidos para metabolizar dichos alcaloides [22]



Figura 15. Cascaras de *Theobroma cacao L.* arrojadas a los cultivos de cacao

Fuente: autoras

En el afán de encontrar una solución a los problemas que este tipo de desechos, genera se han realizado estudios que demuestran, que la cascara de cacao posee un pigmento que es un poliflavonoglucosido, requerido por ser resistente al calor y la luz, es estable y muy utilizado como colorante de alimentos, otros estudios demuestran su altos contenidos de antioxidantes, también se han demostrado que pueden ser usadas para la elaboración de espumas de poliuretano [14]

Recientemente el estudio de un extracto alcalino de las cascara de cacao demostró una posible actividad anti-VIH ya que se observo que este extracto inhibe efectos citopatogenicos de VIH en cultivos celulares.

5.7.2 Desechos procesamiento industrial.

Cascarilla: representan cerca del 12% de la semilla, estas son obtenidas después del proceso de tostado, son tratadas usadas como fuente alimenticia para animales gracias a su contenido de fibra dietaría, pero el contenido de alcaloides restringe su uso. Actualmente han aumentado los estudios relacionados para este tipo de residuos y su posible utilización, debido a que estos representan un importante componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo, constituyendo una buena fuente de recursos renovables y energía. Internacionalmente se viene desarrollando posibles usos de la cascarilla de cacao, como fuente de fertilizantes de suelos[5], alimento para aves y animales[6], fuente de pectinas y gomas[7], elaboración de carbón activado[8]y obtención de fibra dietaría [9-11].

5.8 COMPOSICION QUÍMICA DE LAS CASCARILLAS DE *Theobroma cacao L.* Y SUS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES.

5.8.1 Pared celular de los vegetales.

Todos los vegetales están compuestos por las células vegetales, a diferencia de las células animales, están rodeadas por pared celular fina mecánicamente fuerte. Esta pared consta de una mezcla compleja de polisacáridos y otros polímeros (ver figura 16). Las paredes celulares vegetales también contienen proteínas estructurales, enzimas, polímeros fenólicos y otros materiales que modifican las características físicas y químicas de la pared [34].

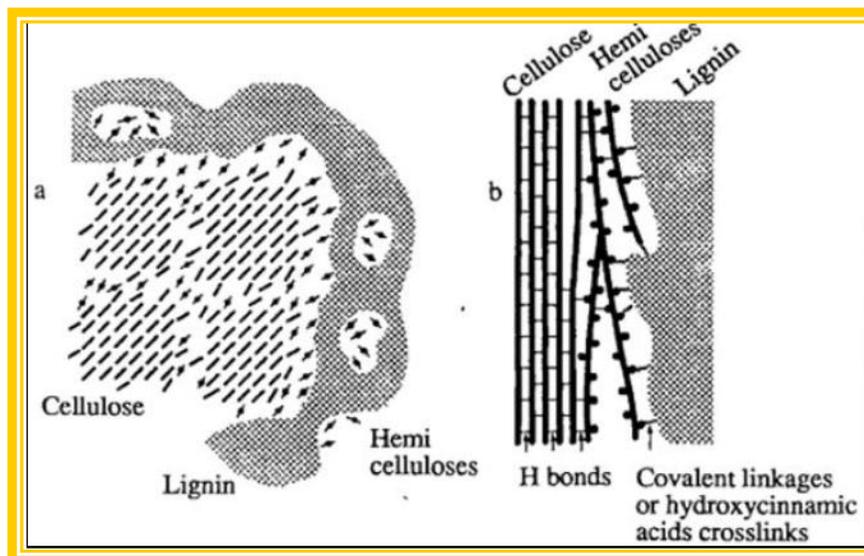


Figura 16. Modelo de la asociación entre la celulosa, hemicelulosa y lignina en las paredes de la madera [35].

A pesar de la diversidad en la morfología de las paredes celulares, estas se clasifican habitualmente en dos tipos: paredes primarias y paredes secundarias. Las paredes primarias son formadas por las células en crecimiento, y las secundarias no la presentan todas las células vegetales y, en la que existe, aparece siempre después de la pared celular primaria proporcionándole sostén, rigidez, y fuerza a la planta [34, 36]

5.9 FIBRA DIETARÍA

Según la Asociación Americana de la Química de los Cereales, la fibra dietaría es conocida como los restos, del esqueleto de las células vegetales, (glúcidos, oligosacáridos, polisacáridos, ligninas y otras sustancias asociadas a los vegetales; considerando componentes no estructurales como gomas, mucílagos y pectinas), no digeribles, estas son muy resistentes a la hidrólisis por enzimas endógenas del sistema digestivo humano y a la digestión y absorción en el intestino delgado, con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La principal fuente de los componentes de fibra dietaría es la pared celular, esta presenta propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas debido a sus regiones amorfas y cristalinas. Las principales propiedades de pared celular son la hidratación, intercambio iónico y adsorción orgánica [37].

5.9.1 Componentes de la fibra dietaria

5.9.1.1 Celulosa

Es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa las cuales están unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos (ver figura 17) de al menos 500 residuos de β -D-glucosa unidos covalentemente. Este tipo de configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cadenas no se presenta aisladas si no unidas entre sí mediante puentes de hidrogeno, formando una estructura supramolecular cristalina, organizada, y resistente a hidrólisis. En la pared secundaria tiene su máximo desarrollo mientras que en la pared primaria son más cortas. Grupos de 36 cadenas lineales con la misma orientación, forma y polaridad constituye una fibrilla elemental. 20 fibrillas elementales forman una microfibrilla de celulosa, el cual es un es el estado típico de la celulosa en la pared celular primaria, 250 microfibrillas forman una fibrilla y unas 1500 fibrillas forman una fibra de celulosa, estructura que solo aparece en la pared celular secundaria. Las fibras de celulosa se estabilizan por enlaces de hidrogeno entre la misma molécula y puentes de oxigeno entre la moléculas adyacentes, formando una estructura fuerte y de gran resistencia [36].

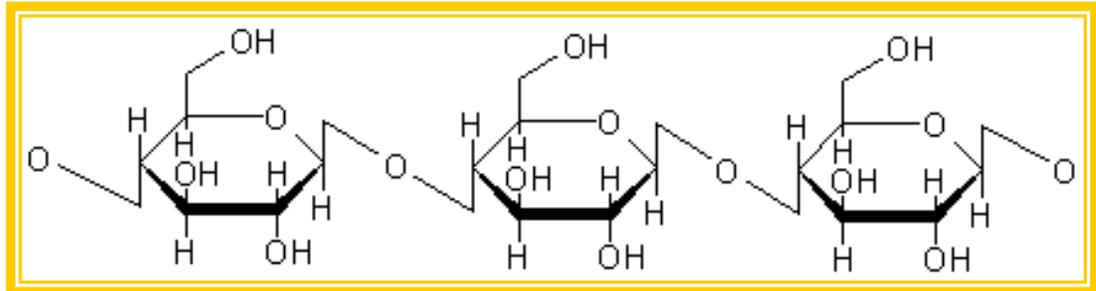


Figura 17. Estructura molecular de la celulosa [36].

5.9.1.2 Hemicelulosa

Son un grupo heterogéneo de polisacáridos (de pentosas, sobre todo D-xilano) ramificados que se unen fuertemente entre si y las microfibrillas de celulosa (ver figura 18), mediante puentes de hidrogeno, tienen estructura amorfa o paracristalina. Las moléculas de hemicelulosa tienen de 200 a 500 monosacáridos por molécula y se sintetizan en el aparato de Golgi. La Hemicelulosa más abundante es el xiloglucano [36].

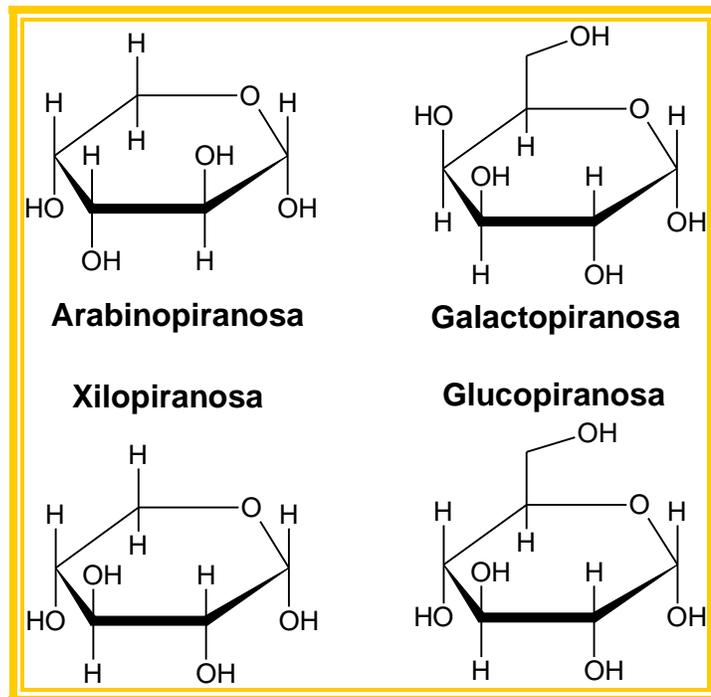


Figura 18. Estructura química de los componentes principales de la hemicelulosa

5.9.1.3 Lignina

Es un material hidrófobo y rígido, formado por, la polimerización de, tres alcoholes aromáticos: cumarílico, coniferílico y sinapílico (ver anexo 1), que se une covalentemente a muchos polisacáridos generando una estructura muy fuerte y resistente a la degradación. Puede depositarse entre las microfibrillas de la celulosa. Contribuyen a dar rigidez a la pared celular haciéndola resistente a impactos y flexiones. La lignificación de los tejidos también permite mayor resistencia al ataque de los microorganismos [36].

5.9.1.4 Pectinas

Son polisacáridos heterogéneos ramificados que contienen numerosos residuos de acidogalacturónico (ver figura 19), lo que les da una carga global negativa y un alto grado de hidratación. Las pectinas suelen ir unidas a calcio como pectatos de calcio, se encuentran en la lámina media de la pared celular vegetal, formando geles rígidos e insolubles [36].

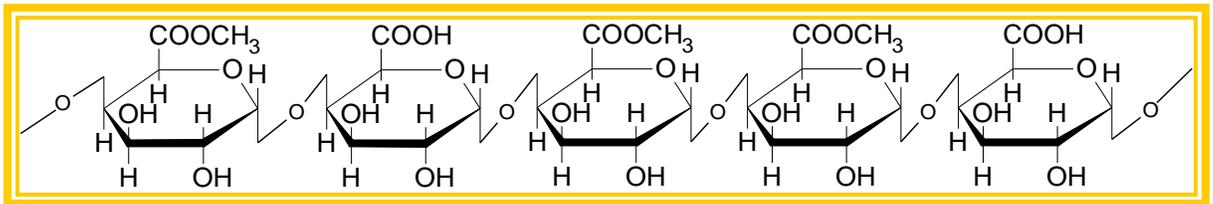


Figura 19. Estructura química del polímero formado por ácido galacturónico.

5.9.1.5 Mucílagos

El mucílago es un producto orgánico de origen vegetal, de peso molecular elevado, superior a 200.000 g/gmol, cuya estructura molecular completa es desconocida. Están conformados por polisacáridos celulósicos que contienen el mismo número de azúcares que las gomas y pectinas. Se suelen confundir con las gomas y pectinas, diferenciándose de estas sólo en las propiedades físicas. Mientras que las gomas se hinchan en el agua para dar dispersiones coloidales gruesas y las pectinas se gelifican; los mucílagos producen coloides muy poco viscosos, que presentan actividad óptica y pueden ser hidrolizados y fermentados [38].

5.9.1.6 Gomas

Al contrario de los mucílagos, estas están formadas por largas cadenas de ácido urónico, xilosa, arabinosa o manosa. Previenen de la transformación de polisacáridos de la pared celular. Se encuentran en arábica, karaya, tragacanto, gelana, gomaguar entre otras (ver figura 20) [36].

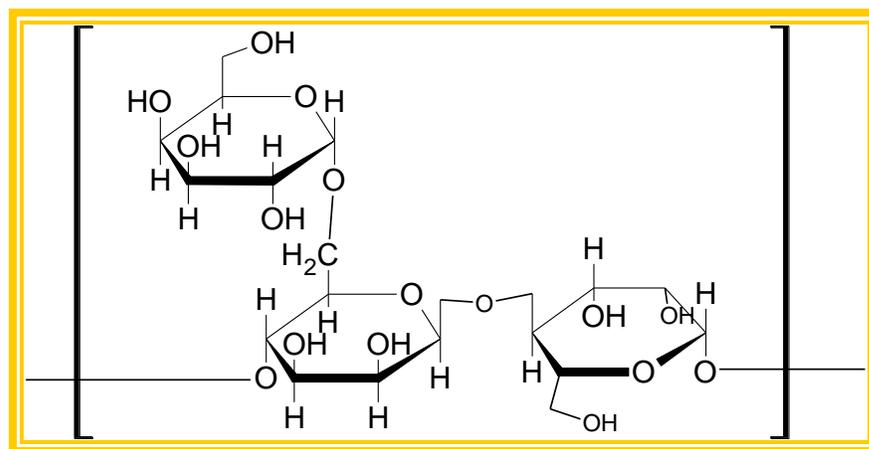


Figura 20. Estructura química goma guar

5.9.2 Clasificación de la fibra dietaría

La fibra, aunque no sea considerada dietéticamente esencial, cumple una serie de funciones benéficas para la salud de animales y humanos. Si bien, son numerosos los elementos que están integrados en el concepto de fibra, no hay una clasificación única. Para mayor simplicidad, se clasificara en fibra soluble y en fibra insoluble. Dicha clasificación es arbitraria y tan solo se basa en la separación química manteniendo unas condiciones controladas de pH y de enzimas que intentan simular las condiciones fisiológicas [39].

La fibra actúa como esponja en el organismo, reteniendo agua, nutrientes, ácidos biliares y agentes carcinogénicos. Se ha comprobado que todos los tipos de fibras tienen diferentes resultados a su paso por el intestino delgado y grueso dependiendo de sus propiedades físico-químicas y funcionales [37], las cuales dependes básicamente de la composición en cuanto a fibra soluble e insoluble [40].

5.9.2.1 Fibra soluble

En contacto con el agua forman un retículo donde queda atrapada, originándose soluciones de gran viscosidad [40]. Los efectos de la viscosidad de la fibra son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado y en parte su potencial anticarcinogénico. Está compuesta por pectinas, gomas, mucilagos y algunas hemicelulosas [41].

5.9.2.2 Fibra insoluble

O poco solubles son capaces de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal. También contribuye a disminuir la concentración y el tiempo de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del colon. Está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. En las fibras dietarias se evalúan como principales propiedades funcionales a nivel *in vitro* [37, 41].

Las propiedades fisiológicas de la fibra dietaría, están afectadas por sus características fisicoquímicas como capacidad de retención de agua, capacidad de retención de moléculas orgánicas, viscosidad, capacidad de intercambio catiónico, capacidad de retención de ácidos biliares, fermentabilidad, etc [40].

5.9.3 Importancia y usos de la fibra dietaría.

De acuerdo con estudios documentados, ahora se acepta que la fibra dietética juega un papel importante en la prevención de varias enfermedades, y que las dietas con un alto contenido de fibra, tales como aquellos que son ricos en cereales, frutas y verduras, tienen un efecto positivo en la salud (ver anexo 2) ya que su consumo se ha relacionado con una menor incidencia de varios tipos de cáncer, enfermedades coronarias, diabetes y problemas digestivos [42]. El consumo de fibra ha adquirido importancia en los últimos años, obligando a la industria alimentaria desarrollar nuevos productos, más saludable y con un alto contenido de fibra dietética, vitaminas, bajo contenido de colesterol y comidas complementadas con ella, que han sido formuladas utilizando materias primas ricas en fibra de cereales (salvado de cereales), de vegetales (cebolla, ajo y alcachofa) y de legumbres [43].

5.9.4 Obtención y caracterización de la fibra dietaría.

Muchos métodos de análisis se han desarrollado durante los últimos años para la extracción de la fibra de plantas, la primera en ser aceptada por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) fue el método de fibra cruda en la cual se utiliza digestión con soluciones ácidas y básicas diluidas; después de la aceptación del método, fue la aceptado el método Fibra Detergente Ácido (FDA), que mide la celulosa y la lignina. También fue aceptado el método de la American Association for Clinical Chemistry (AACC) para la determinación Fibra Detergente Neutro (FDN), el cual dio los valores más altos para la fibra determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina.

La eliminación completa del almidón por medios convencionales era difícil para algunas muestras de alimentos, por lo que el método fue modificado para incluir un tratamiento digestión con α -amilasa para eliminar el almidón residual (Método AACC 32 a 20 1978). Dado que ni la FDA, ni la FDN comprenden todos los componentes que han sido abarcados por la fibra dietaría, al tener en cuenta esto, los científicos presentaron dos métodos para la determinación de Fibra Dietaría Total (FDT) en los alimentos [44]:

- Método enzimático-gravimétrico.
- Un método más amplio, para determinar los componentes individuales de fibra dietaría. Iniciando con el método enzimático-gravimétrico, y complementando el

análisis, con la determinación de los polisacáridos y lignina utilizando los métodos de FDA y FDN [44].

5.9.5 Propiedades fisiológicas de la fibra dietaria

5.9.5.1 Capacidad de retención de agua (CRA)

El objeto de evaluar la capacidad que tiene la fibra de retener agua, es predecir aumento de peso de las heces. Esta capacidad es mucho mayor en fibras solubles que en fibras insolubles. La naturaleza de la fibra y la forma como esta se encuentra ligada a las moléculas de agua influye en la CRA. De esto depende su grado de asociación con efectos saciantes, aumentando así el tamaño del bolo alimenticio, mejorando flujo intestinal e incrementando el volumen y peso de las heces, además de su efecto laxante [43, 45, 46].

5.9.5.2 Capacidad de retención de aceite (CRAc)

La capacidad de retención de aceite (CRAc), es la máxima cantidad de aceite, en gramos, que puede ser retenida por gramo de material seco en presencia de un exceso de aceite bajo la acción de una fuerza. Es sabido que las partículas con gran superficie presentan mayor capacidad para absorber y atrapar componentes de naturaleza aceitosa; la grasa es atrapada en la superficie de la fibra principalmente por medios mecánicos. Se ha observado que las fibras insolubles presentan mayores valores de absorción de grasa que las fibras solubles, sirviendo como emulsificante. A esta propiedad se le relaciona con la composición química, el tamaño y el área de la partícula [45, 46].

5.9.5.3 Capacidad de hinchamiento (CH)

Se refiere a la capacidad del producto para aumentar su volumen en presencia de exceso de agua. Esta propiedad es influenciada por la cantidad de componentes, porosidad y tamaño de partícula de la fibra [45, 46].

5.9.5.4 Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

Esta propiedad puede estar ligada a la absorción de minerales y depende fundamentalmente del medio en que estén las fibras (Fuerza iónica, pH). Algunas fibras se comportan como resinas de bajo intercambio de cationes mono

funcionales debido a la presencia de ácidos galacturónicos en las paredes primarias y glucurónicos en las paredes secundarias [46, 47].

5.10 FERMENTACIÓN

Es un proceso en el que se presentan cambios químicos y físicos en un sustrato de naturaleza orgánica ocurrido del resultado la acción de enzimática microbiana. Es fácilmente denominado como una respiración en ausencia de oxígeno, es un proceso metabólico en donde los carbohidratos y otros compuestos relacionados son parcialmente oxidados, con liberación de energía en la ausencia de algunos electrones aceptores externos. Este proceso anaerobio genera menor energía, que el proceso aerobio [48].

5.10.1 Fermentación bacteriana

El ácido pirúvico, es el intermediario principal en la degradación de la glucosa, su catabolismo involucra muchos mecanismos diferentes que forman una variedad de productos finales característicos de las fermentaciones bacterianas. Los monosacáridos son catabolizados como resultado de la oxidación a ácido pirúvico, a través de una secuencia de pasos metabólicos por enzimas específicas. Las bacterias pueden utilizar vías diferentes para formar ácido pirúvico (ver figura 21) y más de una vía puede ocurrir de manera simultánea en el mismo microorganismo [49].

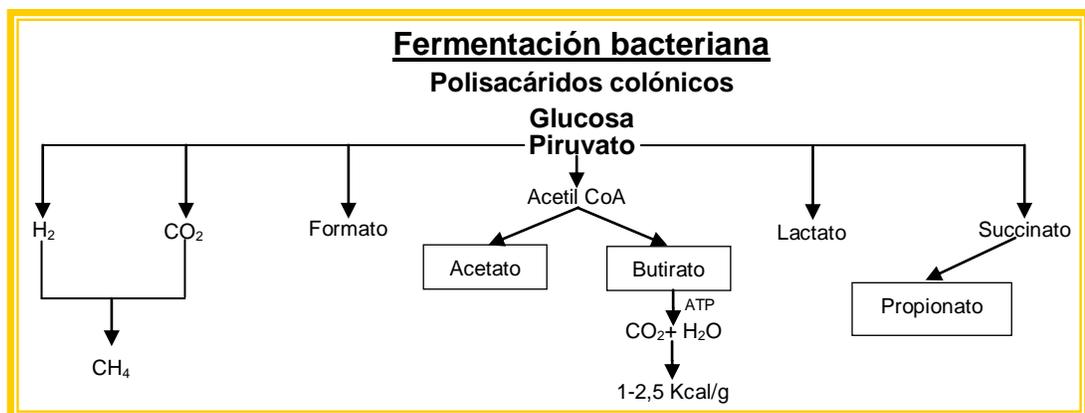


Figura 21. Diagrama sobre el modo de acción de las bacterias en la fermentación [50].

Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son [49]:

- a) Ácido láctico,
- b) Ácido acético y fórmico,
- c) Ácido láctico y alcohol etílico (etanol),
- d) Etanol,
- e) Acetilmetilcarbonil (acetoina) y CO₂,
- f) Ácido succínico a ácido propiónico y CO₂,
- g) Acetona a alcohol isopropílico (isopropanol) y CO₂.
- h) Ácido butírico a alcohol butílico (butanol).

Los patrones de fermentación de acuerdo con los productos finales formados son característicos de diversas clases de bacterias. Según la mayoría de los autores los grupos más importantes de bacterias exhiben uno de los tipos principales de patrones de fermentación (ver tabla 6) [49].

Tabla 6. Genero y especie de bacterias [51].

| Celulolíticas | Hemicelulolíticas | Amilolíticas |
|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> | <i>Ruminococcus spp.</i> | <i>Streptococcus bovis</i> |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> | <i>Succinomonas amilolytica</i> |
| <i>Ruminococcus albus</i> | <i>Bacteroides ruminicola</i> | <i>Bacteroides amylophilus</i> |
| Proteolíticas | Metanogénicas | Lipolíticas |
| <i>Prevotella spp.</i> | <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> | <i>Anaerovibrio lipolytica</i> |
| <i>Selenomonas ruminantium</i> | <i>Methanobacterium formicicum</i> | <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> |
| <i>Eubacterium spp.</i> | <i>Metanomicrobium mobile</i> | <i>Treponema bryantii</i> |
| <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> | | <i>Eubacterium spp.</i> |

5.10.1.1 Fermentación ruminal

Los rumiantes presentan particularidades distintivas en relación con el resto de los mamíferos, debido a que el rumen y el retículo, dos de los compartimientos pre-estomacales, los cuales son cámaras de fermentación anaerobias que se encuentran habitados por una de las más variadas, densas y activas poblaciones microbianas conocidas en la naturaleza (protozoos, bacterias y hongos).

Desempeñan un papel significativo en la degradación del alimento que consumen los animales. Dichas poblaciones microbianas se mantienen gracias al constante consumo de alimento, la regular masticación, añadiendo tampones y eliminando los ácidos formados al igual que materiales de desecho como: productos microbianos y materia no digerida de esta forma se garantiza condiciones

adecuadas de pH, temperatura y humedad para el crecimiento microbiano. Los rumiantes establecen una simbiosis con los microorganismos ruminales en el cual el rumiante aporta nutrientes y un medio ruminal adecuado para la supervivencia de los microorganismos y la fermentación de los alimentos, y los microorganismos aportan la capacidad de utilizar la fibra y proteína microbiana sintetizada en el rumen, y que constituyen la fuente principal de energía y proteína, respectivamente, para el animal [52].

Los alimentos consumidos por el animal (Fibras y otros polímeros vegetales insolubles) que no son digeridos por las enzimas, son fermentados por las bacterias a Ácidos Grasos Volátiles (AGV) (ver anexo 3). Los AGV pasan a través de las paredes del rumen llegando a la sangre, en el hígado son oxidados y convirtiéndose en la mayor fuente de energía para las células [35, 53]. Los ácidos grasos de cadena corta, también pueden ser absorbidos a través de la mucosa intestinal y presentan funciones importantes en el ámbito del colon como la disminución del pH, efecto trófico, producción de energía, etc., y en el ámbito sistémico influyen sobre el metabolismo de lípidos, la glucemia, etc, [54].

5.10.1.2 Productos obtenidos de la fermentación ruminal.

La población microbiana del rumen, está constituida por bacterias, hongos y protozoos (ver anexo 4) El 25 % de las bacterias se encuentran en la fase líquida del rumen, el 70% adherida a las partículas en suspensión y un 5% adherida a los protozoos o a la pared ruminal [55]. Aunque el tipo y la proporción de microorganismos varían en función del tipo de alimento [56]. Cada uno de estos microorganismos cumple un papel en el proceso de digestión.

Las bacterias, actúan como los principales agentes en la fermentación de los carbohidratos estructurales y la proteína de las plantas. Los protozoos se encargan de la digestión de carbohidratos no estructurales, intervienen en el fraccionamiento físico del alimento y juegan un importante papel como reguladores del pH ruminal. Los hongos son los primeros organismos en invadir y digerir el componente estructural de las plantas y tienen una relación estrecha con las bacterias permitiendo así que estas penetren al compartimiento intracelular y colonicen el material vegetal, iniciando el proceso de degradación de las fracciones insolubles del alimento [56].

La producción de proteína microbiana en un sistema ruminal eficiente debe ser mayor con relación con la producción de AGV. Aunque este resultado depende de diversos factores como la disponibilidad de nutrientes esenciales, principalmente amonio, azufre, aminoácidos ramificados, fósforo, péptidos y

minerales trazas. Igualmente, se deberá trabajar en la obtención de alta digestión de compuestos estructurales (celulosa, hemicelulosa, lignina, y otros); incrementos en la proporción molar de ácido propiónico y sustratos glucogénicos totales; así como en la reducción de la proteólisis, amilolisis y metanogénesis ruminal [57]. La fermentación microbiana del rumen da lugar como productos finales Ácidos Grasos Volátiles (AGV), gases (CO_2 y CH_4), calor y energía bajo forma de adenosíntrifosfato (ATP) [58].

5.10.1.2.1 Análisis de Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

Los productos de mayor relevancia formados en la fermentación ruminal son los AGV, (ac. acético, ac. propiónico y ac. butírico) este tipo de compuestos se miden indirectamente a través de análisis de alcalinidad, y han sido señalados como un parámetro de control de reactores. La determinación cuantitativa directa de los AGV, más común, se hace por métodos cromatográficos en especial mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de flama. También se usa la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) utilizando para ello, columnas de intercambio iónico, otra técnica útil es la electroforesis capilar aunque es bastante costosa y poco utilizada [59].

5.11 FUNDAMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS

5.11.1 Métodos químicos de análisis de fibra dietaría

Los métodos más usuales para la determinación de la fibra dietaría al igual que sus componentes principales son determinados por métodos gravimétrico-enzimáticos que permiten cuantificar la proporción de fibra soluble y fibra insoluble. Los contenidos de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectinas individualmente se pueden cuantificar usando el método que involucran detergentes neutros y detergentes ácidos [54].

5.11.1.1 Método Gravimétrico-enzimático para la determinación de fibra soluble e insoluble

el sistema gravimétrico-enzimático implementado para la determinación de fibra soluble y fibra soluble se basa en el uso de las enzimas [54].

5.11.1.1.1 α -amilasa Termoestable

Es una enzima extracelular que hidroliza los enlaces α 1-4 glicósidos de polisacáridos, tales como el almidón, glicógeno o productos de degradación de los mismos(ver figura 22), su actividad requiere de la presencia de iones cloruro [60].

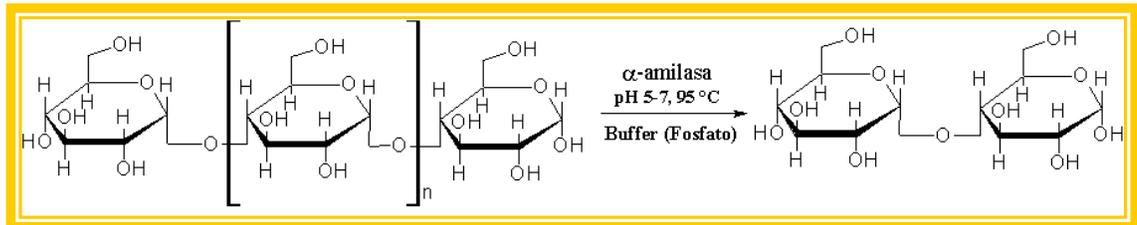


Figura 22. Reacción hidrólisis enzimática del almidón con α -amilasa

5.11.1.1.2 Proteasa

Es una enzima extracelular que degradan las proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos dando como resultado cadenas más cortas (péptidos) o aminoácidos libres [61].

5.11.1.1.3 Amiloglucosidasa

Es un biocatalizador capaz de hidrolizar los enlaces α -1,4 glucósidos de la maltodextrina para convertirlos en β -D-glucosa (ver figura 23) [62, 63].

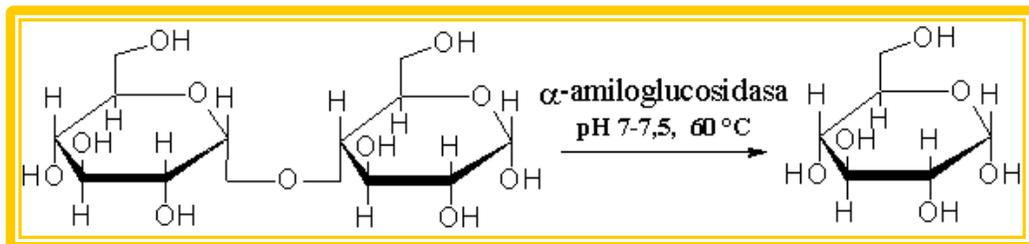


Figura 23. Reacción hidrólisis enzimática de la maltodextrina con la α -amiloglucosidasa

5.11.1.2 Fibra Detergente Neutro(FDN)

La fracción de FDN incluye celulosa, hemicelulosa y lignina como los componentes principales. Este tipo de métodos ha sufrido varias modificaciones, entre las cuales las más relevantes, incluye el uso de sulfito de sodio para reducir la contaminación con nitrógeno y el uso de amilasa termo estable para remover el almidón. La fracción FDN de los alimentos mide la cantidad total de fibra y cuantifica diferencias entre los alimentos, de una forma más racional en

comparación con otras fracciones de fibra. Además esta fracción ha sido relacionada con otros aspectos de la nutrición como el consumo, la densidad del alimento, la actividad masticatoria de los animales, la digestibilidad de la dieta y la tasa de degradación ruminal [54, 64].

5.11.1.3 Fibras Detergentes Acido(FDA)

Esta fracción de los alimentos incluye celulosa y lignina como componentes primarios además de cantidades variables de otros compuestos, por ellos se considera importante que la determinación de FDA se haga sobre el residuo de FDN, es decir en forma secuencial, ya que los valores de FDA pueden estar sobre estimados, debido a la presencia de residuos como pectinas y otros compuestos que son solubilizados en la FDN pero no en la FDA. El método FDA puede ser usado como un paso preparatorio para la determinación de lignina y celulosa.

El detergente neutro disuelve pectinas, taninos y una cantidad variable de sílice, mientras que el detergente ácido recupera sílice, complejos taninos-proteína y parcialmente pectinas. El residuo detergente ácido es generalmente más bajo en proteínas que el residuo de detergente neutro, de la diferencia de estos residuos se puede estimar la cantidad de Hemicelulosa [54, 64].

5.11.1.4 Fermentabilidad

La fermentabilidad o capacidad de degradabilidad de la fibra dietaría se determina básicamente mediante la cuantificación de ácidos grasos volátiles formados en una fermentación bacteriana. La determinación de la degradabilidad se puede realizar por métodos *in vivo*, *in situ* o *in vitro*. Las técnicas *in vivo* son muy costosas y están altamente tecnificadas, por lo que los métodos *in situ*, son las técnicas de elección más utilizadas. Cabe destacar que la población microbiana ruminal se ve afectada por numerosos factores, así la procedencia del inóculo ruminal se considera la mayor fuente de variación en la determinación de la digestibilidad, degradabilidad y producción de gas *in vitro*. En este sentido, la ración ingerida por los animales empleados como donantes en las técnicas *in vitro* ha sido señalada como uno de los principales factores que afectan al número y actividad de los microorganismos ruminales y que consecuentemente pueden afectar a los valores de la digestibilidad *in vitro* de los alimentos [65, 66].

5.11.2 Técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia(CLAE)

La cromatografía es un método utilizado para la separación de componentes de una muestra, la cual se distribuye en dos fases, una estacionaria y una móvil, la fase estacionaria puede ser sólida o un líquido retenido en un sólido o un gel, la fase móvil es un líquido, el cual es un parámetro fundamental que rige la separación. En CLAE es necesario encontrar detectores que diferencien el soluto en solución de la fase móvil. Los más difundidos son los detectores UV y en menor proporción los de Fluorescencia, el de índice de refracción y el electroquímico. Con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares simplemente modificando la composición de la fase móvil y La amplia variedad de solventes aptos para ser empleados como fase móvil otorga versatilidad para diferentes tipos de análisis [67].

Detector UV/Visible

Es el detector más empleado en CLAE. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que estos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. Es un detector poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura. Este detector operara entre 190 y 350nm, y en algunos equipos pueden extenderse hasta la zona del visible del espectro recibiendo el nombre de detector UV/Visible. Para la cuantificación de la concentración del analito se determina mediante la ley de Beer [67].

6. METODOLOGIA

6.1 MATERIAL DE ANALISIS.

6.1.1 Material Vegetal.

Se empleo cascarilla de las semillas de cacao (*Theobroma cacao L.*) secas y tostadas (mezcla de diferentes especies de cacao) suministradas por una Industria Chocolatera Colombiana (ver figura 24). Las muestras se llevaron al laboratorio de OLEOQUIMICA y conservaron en nevera a 4°C.



Figura 24. Material vegetal
Fuente: autoras

6.1.2 Molienda.

Se realizó la molienda de la cascarilla en un molino de cuchillas (ver figura 25), el polvo obtenido se conservo en bolsas Ziploc a 4°C, para su posterior análisis.



Figura 25. Molino de cuchillas
Fuente: autoras

6.2 PRETRATAMIENTO DE LA CASCARILLA DE *Theobroma cacao* L.

6.2.1 Extracción de compuestos polares de la cascarilla de cacao.

A 50g de cascarilla de cacao se adicionó 500mL etanol al 95% y se centrifugo durante 30 minutos a 1000rpm con una relación muestra solvente de 1:10 [11, 12].

6.2.2 Extracción de Lípidos.

Se llevo a cabo un desengrase de la cascarilla de cacao por medio de soxhlet utilizando como solvente hexano relación 1:10 durante 12 horas [11].

6.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CASCARILLA DE CACAO.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en las mismas condiciones.

6.3.1 Obtención de fibra soluble (FS) y fibra insoluble (FI)

Se realizo el análisis con base en el método 985.29de la AOAC [11, 68], (Ver figura 26) En los siguientes pasos:

Se peso 1g de la muestra de la cascarilla molida, en una balanza analítica marca ADVENTURER OHAUS con una precisión de ± 0.0001 , se llevo a un beaker de 250mL, se adiciono una solución buffer de fosfato 0.08M, pH 6.02en relación muestra: buffer de 1: 50 [11, 68]. A esta solución se le adicionó 100 μ L de α -Amilasade *Bacillus licheniformis*, de (50mg/mL). Se cubrió con papel aluminio y se llevó a un baño maría durante 15min a una temperatura de 95°C. Se retiró del baño y se dejó enfriar a temperatura ambiente [11, 68]. Se midió el pH, se ajustó pH entre 7.5 y 7.6 con solución de NaOH 0.2685 N, se adiciono 100 μ L de Proteasa de *Bacillus licheniformis* de (50mg/mL), preparada con solución buffer de fosfato 0.08M, pH 6.02; se cubrió el vaso de precipitado con papel aluminio, se llevó a baño maría durante 30 min con agitación constante y a 60°C. después de este tiempo se retiró del baño, se dejó enfriar a temperatura ambiente [11, 68]. Se midió el pH y se ajustó entre 4-4.5 usando una solución de HCL 0.3486 N, se adicionó 100 μ L de Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, de (50mg/mL). Se cubrió el beaker con papel aluminio, se llevó a un baño maría durante 30 min con agitación a 60°C. se retiró del baño dejándose enfriar a temperatura ambiente[11, 68].

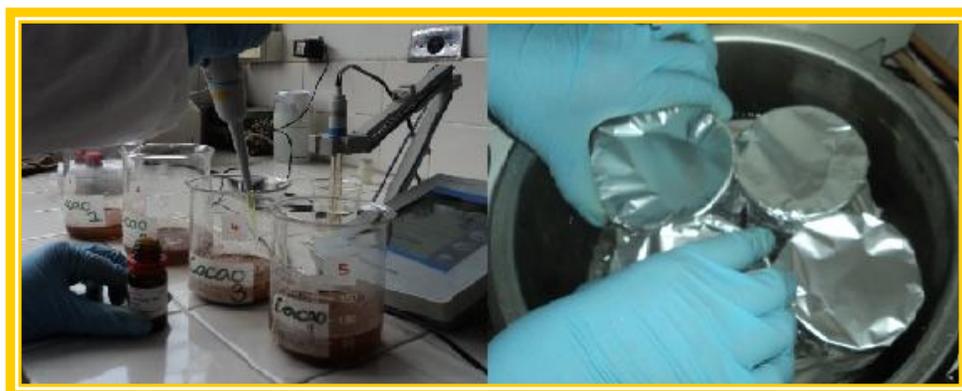


Figura 26. Procedimiento de hidrólisis enzimática
Fuente: autoras

6.3.1.1 Separación de la Fibra Insoluble (FI) y la Fibra Soluble (FS)

6.3.1.1.1 Fibra Insoluble (FI)

El hidrolizado obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró al vacío en equipo Buchner sobre un papel filtro Whatman N° 41 banda negra, se realizaron dos lavados de 10 mL de agua destilada cada uno, el filtrado se secó en una estufa BINDER a 105°C por 24 h. Posteriormente se dividió el filtrado seco (ver figura 27), en dos porciones, para posterior análisis de cenizas y proteínas [11, 68].

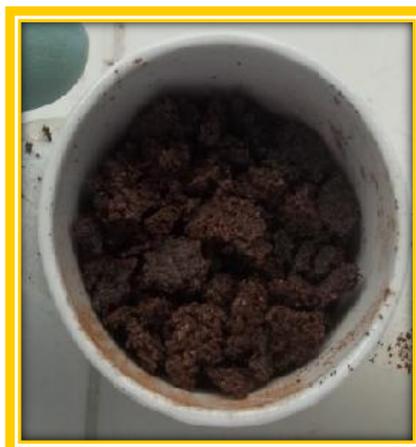


Figura 27. Filtrado después del secado.
Fuente: autoras

6.3.1.1.2 Fibra Soluble (FS)

Al sobrenadante de filtración, se le adicionaron 200mL de etanol al 95%, (ver figura 28), y se dejó reposar durante 24h. Luego se filtro al vacio sobre un papel filtro Whatman N° 41 banda negra, al filtrado se les realizo tres lavados con 20mL etanol al 78%, dos lavados con 10mL de etanol al 95% y dos lavados con 10mL acetona. Se seco en la estufa a 105°C durante 24h [11, 68], para posteriores análisis de cenizas y proteínas.



Figura 28. Precipitación de la fibra soluble
Fuente: autoras

6.3.1.2 Determinación de cenizas

Las muestras de FS y FI se depositaron en crisoles previamente tarados (ver figura 29), y se llevaron a una mufla a una temperatura de 525°C, durante 5h [11, 68].



Figura 29. Determinación de cenizas
Fuente: autoras

6.3.1.3 Determinación de proteínas

Se determinó el contenido de nitrógeno según el método 920.87 de la AOAC [11, 68]. Se realizó la digestión con H_2SO_4 concentrado y posterior destilación según método AOAC, en un equipo VELP SCIENTIFICA (ver figura 30) el producto de destilación se valoró con HCL 0.00122N utilizando indicador mixto (rojo de metilo y azul de metileno).



Figura 30. Equipo Kjeldahl
Fuente: autoras

6.3.2 Análisis de la composición química de la fibra dietaria

6.3.2.1 Fibra Detergente Neutra (FDN)

Se determinó con base al método van Soest y Wine's [11]

Se pesó 1g de cascarilla de cacao, se le adicionaron 15mL de solución de α -amilasa 4.250mg/L y se dejó en incubación a baño maría por 12h a 60°C. La solución se trasvasó a un balón de fondo redondo de 250mL se le adicionaron 100mL de detergente neutro, 2mL de decahidronaftaleno y se llevó a reflujo a baño maría a 60°C/1h.30min (ver figura 31). Se dejó reposar a temperatura ambiente, y la fibra se filtró al vacío, en embudo Bunchner sobre papel de filtro Whatman N° 41 banda negra. Finalmente la fibra se secó en estufa a 105°C por 24h y se llevó a peso constante. Posteriormente se conservó en desecador el análisis de cenizas [11].



Figura 31. Determinación de FDN

Fuente: autoras

6.3.2.2 Fibra Detergente Acida (FDA)

En un balón de 250mL se adicionó 1g de cascarilla y 100mL de detergente ácido al 2% (bromuro de acetiltrimetil amonio en H_2SO_4 1N), se llevó a refluxo en un baño maría $60^\circ C/1h.30min$ (ver figura 32). Se dejó reposar a temperatura ambiente, se filtró en Buchner con vacío. La fibra se secó en estufa a $105^\circ C$ por 24h y se llevó a peso constante. Posteriormente se procedió a la determinación de lignina [11].

6.3.2.2.1 Determinación de Lignina

Se hizo con la fibra detergente acida pesando 0.5g con adición de 30mL de H_2SO_4 a 72% por 3h y con agitación constante durante 1h, a temperatura ambiente. La solución resultante se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 1L y se filtró al vacío sobre un papel Whatman N° 41 banda negra, el filtrado se lavó, dos veces con 10mL de agua destilada, se secó en estufa a $105^\circ C$ por 24h. Se llevó a peso constante, y se conservó en el desecador para su posterior análisis de cenizas [11].



Figura 32. Determinación de FDA

Fuente: autoras

6.4 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA FIBRA DIETARIA

6.4.1 Capacidad de retención de agua (CRA)

En un tubo de centrifuga se peso 0.4g de fibra, se adicionó 5mL de buffer de fosfato 0.08M, pH 6.1, se agitó por 10min manualmente, se dejó en reposo durante 24 h, y pasado este tiempo se centrifugó en una centrifuga (Hettich EBA 20 a 3000rpm) por 10min, se retiró el sobrenadante y se pesó el sedimento [45, 69].

6.4.2 Capacidad de retención de aceite (CRAc)

En un tubo de centrífuga, se pesaron 0.4g de fibra, se adicionó 5mL aceite de soya comercial, se agitó manualmente durante 10 minutos, se dejó en reposo durante 24h a temperatura ambiente, después se centrifugó a 3000rpm por 10min, se retiró el sobrenadante y se pesó el residuo [45, 69].

6.4.3 Capacidad de hinchamiento (CH)

0.4g de fibra se le midió el volumen que ocupa en una probeta de 10 mL, luego se le adicionaron 5mL de buffer de fosfato 0.08M, pH 6.1, se agitó y dejó en reposo por 24h a temperatura ambiente posteriormente, se midió el volumen final de la muestra [45, 69].

6.4.4 Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

Se pesaron 0.4g fibra y en un beaker se mezclaron con 10mL de ácido clorhídrico 2N, se dejó en reposo por 24h a temperatura ambiente y luego se eliminó el ácido por decantación, se le adicionó 5mL de agua destilada. Los iones captados por la muestra se determinaron por titulación con NaOH 0,2685N [69].

6.5 DEGRADABILIDAD *in-vitro* DE LA FIBRA SOLUBLE E INSOLUBLE

6.5.1 Recolección del rumen.

El líquido ruminal para el análisis de fermentación bacteriana fue proporcionado por la empresa **PLANTA Y FRIGORIFICO DEL OTUN FRIGOTUN S.A.T LTDA** (ver figura 33). De la ciudad de Pereira, en el km 3 vía a Marsella-Risaralda.

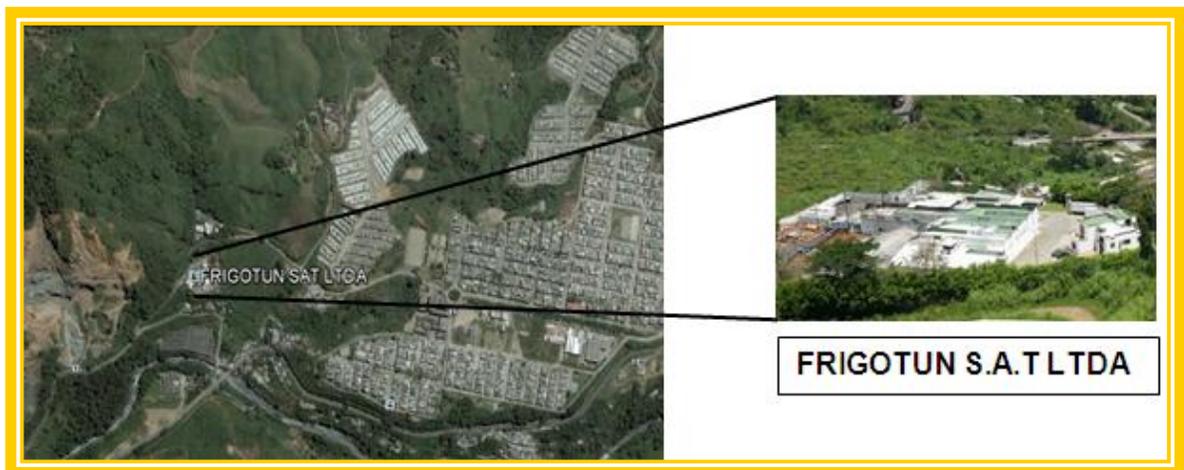


Figura 33.Ubicación de la empresa PLANTA Y FRIGORIFICO DEL OTUN
FRIGOTUN S.A.T LTDA.

Fuente: Google Earth

Las muestras fueron recolectadas con la ayuda del médico veterinario encargado del control en el centro de sacrificio. Se obtuvieron aleatoriamente de bovinos procesados en el camal, se recolectaron en envases esterilizados de 50mL y se transportaron las muestras en termos a 39°C hasta el laboratorio de OLEOQUIMICA de la Universidad Tecnológica de Pereira, donde fueron filtradas a gravedad usando gasa estéril y se almacenaron en tubos de ensayo estériles a 4°C, para su posterior análisis.

6.5.2 Sistema de Fermentación Ruminal *In-Vitro*

6.5.2.1 Preparación de saliva artificial

Se prepararon las siguientes soluciones:

- **Solución macrominerales:** contiene 0.855g de Na_2HPO_4 , 0.93g de KH_2PO_4 , y 0.9g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 35mL de agua de destilada.
- **Solución tampón:** contiene 5.25g de NaHCO_3 y 0.6g de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$.
- **Agente reductor:** contiene, 7mL de agua destilada, 0.3mL de $\text{NaOH}1\text{N}$ y cisteína-HCl. (47mg cisteína en 200 μL de HCl 1N).

En un vaso de precipitado se mezcló: 71 mL de agua destilada, la solución de macrominerales y la solución tampón, se llevaron a un baño maría 39 °C por 15 min, luego se añadió el agente reductor [65].

6.5.2.2 Fermentación Ruminal.

Este proceso, se llevó a cabo para fibra soluble y fibra insoluble bajo las mismas condiciones. En un balón de tres bocas se añadieron 40 mL de saliva artificial, 10 mL de inóculo microbiano (Líquido ruminal previamente filtrado) y 500 mg de fibra [70]. Se llevó a un baño maría en un termostato ThermoScientific a 39°C suministrando CO₂ por 15 min. Después de transcurridas 72 horas de incubación (ver figura 34), se desmontó el reactor, se filtró y el filtrado se secó y se llevó a peso constante [65]. El sobrenadante se usó para el análisis de ácidos grasos volátiles.



Figura 34. Fermentación ruminal *in vitro*

Fuente: autoras

6.5.2.2.1 Análisis de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE).

6.5.2.2.1.1 Análisis cualitativo.

Este análisis se realizó por comparación de tiempo de retención (*t_r*) por CLAE, empleando el estándar de ácido Propiónico al 98% Carlo Erba grado analítico, bajo las condiciones descritas en la tabla 7.

Tabla 7. Análisis del contenido de ácido grasos volátiles por CLAE.
CONDICIONES DE ANÁLISIS

| | |
|---------------------------------|--|
| Equipo | Cromatógrafo líquido HITACHI LaChrom; bomba L-2130; horno L-2300; detector UV-Vis L-2420 |
| Software | EZChrom Elite® data system |
| Columna | Pinnacle DB C ₁₈ (3 µm x 100mm x 3,2mm) |
| Temperatura | 25°C |
| Fase móvil | H ₂ O:H ₂ SO ₄ (5:95) |
| Flujo | 0,2 mL / min |
| Volumen de inyección | 20µL |
| Longitud de onda λ (nm). | 215 nm |

6.5.2.2.1.2 Análisis cuantitativo

Se hizo por CLAE empleando las mismas condiciones que el análisis cualitativo y se realizó por el método de estándar externo, realizando una curva (área de picos versus concentración de patrones), con seis puntos (20, 50, 80, 100, 300, 500ppm) y por triplicado.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 DESCRIPCIÓN FÍSICA DE LA CASCARILA DE *Theobroma cacao* L.

En la tabla 8 se presentan las principales características físicas de la cascarilla estudiada.

Tabla 8. Propiedades físicas de la cascarilla de *Theobroma cacao* L. y sus principales características.

| PROPIEDAD FÍSICAS | CARACTERÍSTICAS |
|-------------------|--|
| Color | Presenta diferentes tonalidades de marrón |
| Olor | Característico del chocolate |
| Forma | Irregular |
| Textura | Algunas con textura rugosa , otras con textura lisa y quebradiza |
| Tamaño | Variado no superior a 1cm de longitud |

Cabe resaltar que las cascarillas suministras por la industria procesadora de cacao, son procedentes de una mezcla de materias primas que le confiere una alta heterogeneidad a sus diferentes propiedades físico-químicas (ver figura 35).



Figura 35. Cascarillas de las semillas de *Theobroma cacao* L.
Fuente: autoras

7.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CASCARILLA DE *THEOBROMA CACAO L.*

Del proceso de hidrólisis enzimática se obtuvieron dos productos uno sólido Residuo Gravimétrico de Fibra Insoluble (RGFI) y uno líquido correspondiente al del Residuo de Fibra Soluble (RFS).

7.2.1 Caracterización de Fibra Insoluble (FI) y Fibra Soluble (FS)

- El contenido de FI se calculo a partir de la diferencia Del RGFI y su contenido de proteínas y cenizas (ver Anexo 6, Tabla 9) los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11.
- Para determinar el contenido de FS, se obtuvo el Residuo Gravimétrico de Fibra Soluble (RGFS) por precipitación con etanol del RFS. Posteriormente al RGFS se le determino el contenido de cenizas y proteínas (ver Anexo 6, Tabla 10) y por diferencia como en el caso anterior, se calculo el contenido de FS. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11.

Tabla 9. El contenido de FI en la cascarilla de *Theobroma cacao L.*

| Ensayo \ Muestra | Peso (g) | RGFI (g) | Cenizas (g) | Proteínas (g) | FI (% BS) |
|------------------|----------|----------|-------------|---------------|-----------|
| 1 | 1.0039 | 0.8161 | 0.143 | 0.0052 | 66.5 |
| 2 | 1.0047 | 0.8601 | 0.128 | 0.0075 | 72.5 |
| 3 | 1.0030 | 0.7443 | 0.112 | 0.0072 | 62.3 |
| Blanco | 0 | 0.0011 | ----- | ----- | ----- |
| PROMEDIO | 1.0039 | 0.8068 | 0.128 | 0.0064 | 67.1 |
| DESVIACION | 0.00085 | 0.0580 | 0.0155 | 0.0016 | 5.1 |

$$\%FI = \frac{(RGFI - C - P - B)}{M} \times 100$$

FI: Fibra Insoluble; RGFI: masa Residuo Gravimétrico Fibra Insoluble; C: masa de cenizas; P: masa proteínas; B: blanco; M: masa muestra

Tabla 10. El contenido de FS en la cascarilla de *Theobroma cacao L.*

| Muestra Ensayo | Peso (g) | RGFS (g) | Cenizas (g) | Proteínas (g) | FS (% BS) |
|-------------------|-------------|-------------|----------------|------------------|--------------|
| 1 | 1.0039 | 0.1422 | 0.039 | 0.0020 | 10.1 |
| 2 | 1.0047 | 0.1238 | 0.032 | 0.0017 | 8.9 |
| 3 | 1.0030 | 0.1078 | 0.036 | 0.0012 | 7.0 |
| Blanco | 0 | 0.0008 | ----- | ----- | ----- |
| PROMEDIO | 1.0039 | 0.1246 | 0.036 | 0.0016 | 8.7 |
| DESVIACION | 0.00085 | 0.0172 | 0.0035 | 0.0004 | 1.6 |

$$\%FS = \frac{(RGFS - C - P - B)}{M} \times 100$$

FI: Fibra Insoluble; RGFI: masa Residuo Gravimétrico Fibra Insoluble; C: masa de cenizas; P: masa proteínas; B: blanco; M: masa muestra

Tabla 11. Contenido de Fibra Soluble (FS), Fibra Insoluble (FI) y Fibra Total (FT).

| Muestra Ensayo | FI (% BS) | FS (% BS) | FDT (% BS) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|
| 1 | 66.5 | 10.1 | 76.5 |
| 2 | 72.5 | 8.9 | 81.4 |
| 3 | 62.3 | 7.0 | 69.3 |
| PROMEDIO | 67.1 | 8.7 | 75.7 |
| DESVIACION | 5.1 | 1.6 | 6.1 |

Los valores obtenidos en los análisis de FS, FI y FDT aunque presentan dispersión entre ellos, pueden considerarse aceptables para ese tipo de análisis, debido a que el método enzimático implementado presenta problemas en la remoción de almidón y proteína, sobreestimando la concentración de Fibra dietaría Total (FDT) [64], esto coincide con la comparación de la desviación estándar de otros estudios realizados a cascarilla de cacao (forastero) [71]. Igualmente, la dispersión de los datos puede ser causada por la naturaleza heterogénea de la muestra.

En la figura 36, se presenta el diagrama con la información del producto de hidrólisis de la cascarilla de cacao nacional, inicialmente se realiza una comparación porcentual de los RGFI y RGFS con respecto a la cascarilla, obteniéndose un 80 y 13% respectivamente, de estos residuos, el porcentaje de

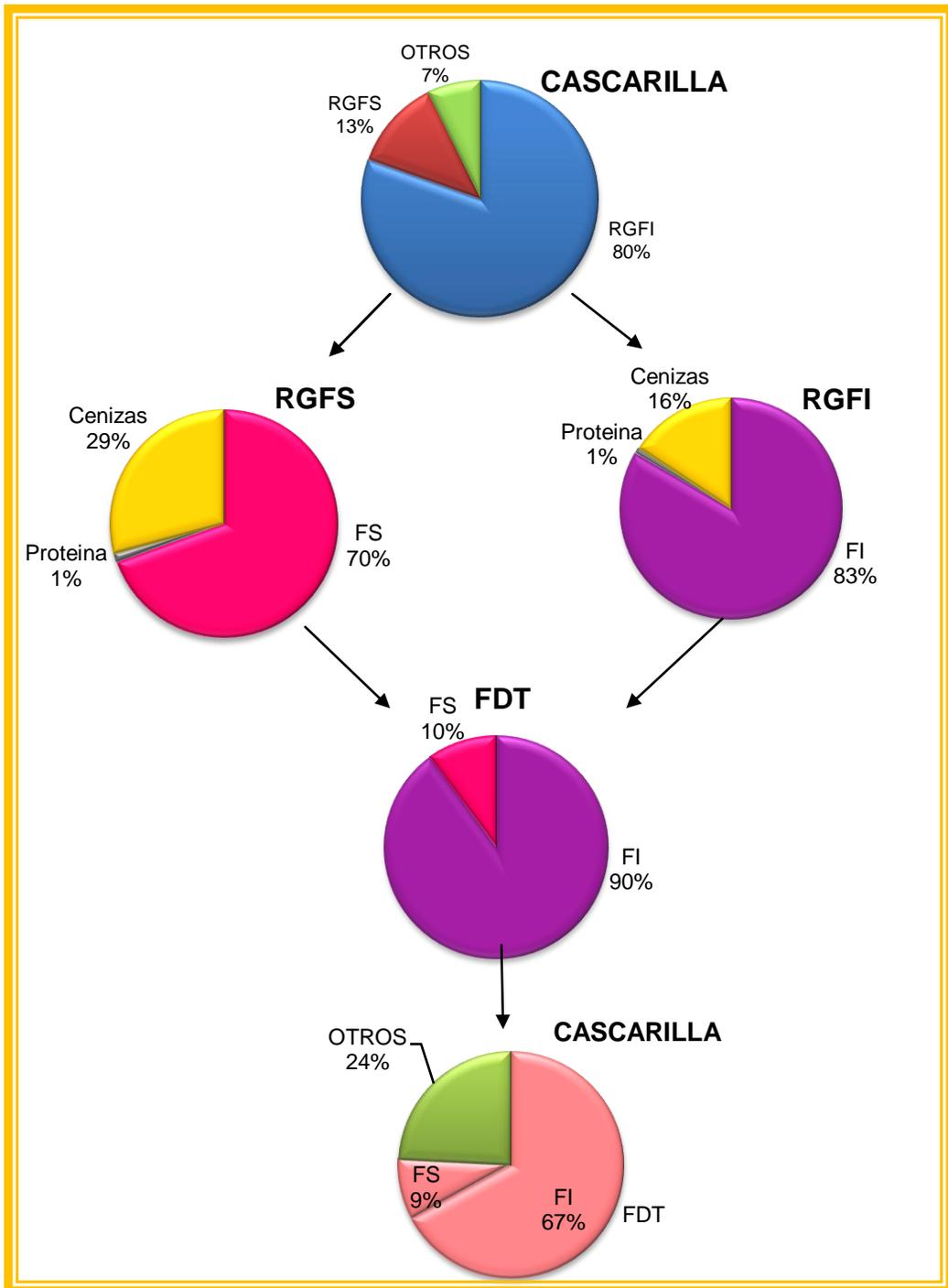


Figura 36. Diagrama de relación de la composición de los productos de la hidrolización enzimática de la cascarrilla de cacao y su composición de Fibra Soluble (FS) y Fibra Insoluble (FI).

cenizas en ambos casos influye directamente en el contenido de FS y FI en la cascarilla, haciendo que estos sean inferiores y que la relación FI/FS pase de 6:1 a 8:1 en la cascarilla, la cual es comparable con la relación de otros alimentos considerados fuentes de fibra dietaría (ver ANEXO 7). Aunque el aporte de fibra dietaría de la cascarilla de cacao de este estudio no cumple con la relación de FI/FS de excelente (2:1), ni adecuado (3:1) [72, 73] no es descartada para su uso como fuente de fibra dietaría, en la elaboración de alimentos procesados, ya que la calidad de una fibra depende de la composición equilibrada entre las fracciones soluble e insoluble, cuanto más equilibrada esté, más funciones fisiológicas puede aportar en la nutrición.

Continuando con el análisis de la figura 36 el contenido de FDT se representa en un 10% en FS y un 90% en FI, con respecto a la cascarilla de cacao de la industria nacional el contenido de FI es de 67.1% y 8.7% de FS; Estos valores comparados con los reportados por otros autores (ver Figura 37) para cascarilla de cacao trinitario [74] (51.1%FI y 16.9%FS) y forastero [75] (49.1%FI y 11.7%FS) resultan ser más bajos para fibra soluble y más altos para fibra insoluble, esta diferencia puede atribuirse a la muestra de cacao que es una mezcla de cacaos en los que se incluye las variedades de criollo forastero y trinitario.

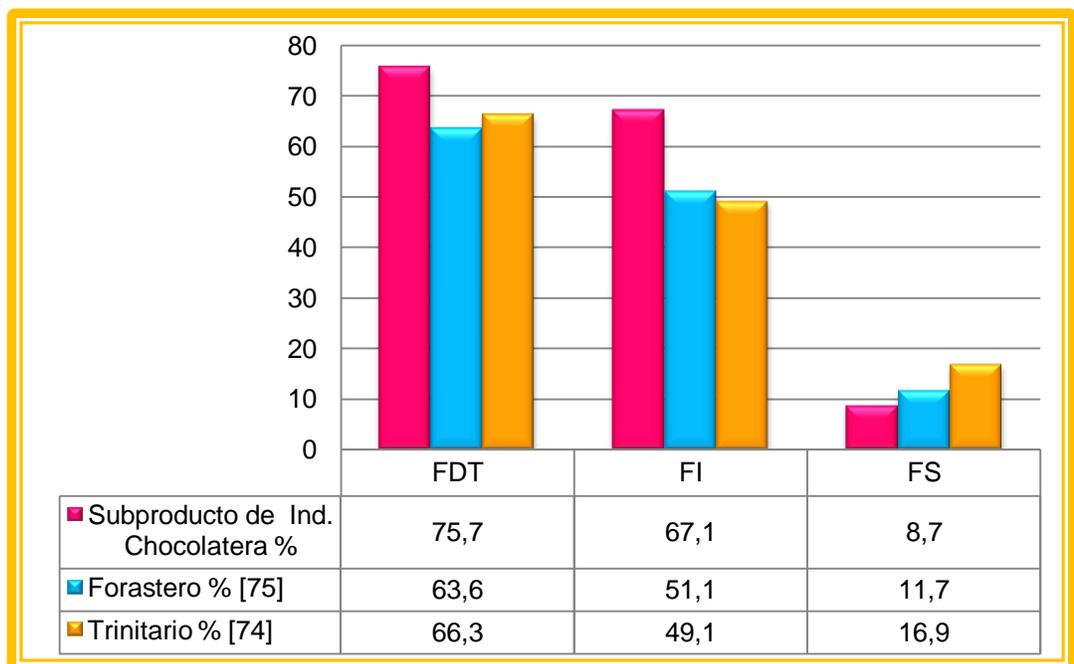


Figura 37. Esquema de comparación entre los contenidos de Fibra Insoluble (FI), Fibra Soluble (FS) y Fibra Dietaría Total (FDT) de cascarilla de *Theobroma cacao L.* de diferentes variedades.

7.2.2 Composición química de la cascarilla de *Theobroma cacao L.*

En este estudio se evaluó el contenido de celulosa, hemicelulosa y pectinas indirectamente (ver Tabla 16), con los valores del contenido de Fibra Detergente Neutra (FDN) (ver Tabla 12), Fibra Detergente Acida (FDA) (ver tabla13) y lignina (ver tabla 15). Los cuales se determinaron directamente, en la tabla 14 se muestra los resultados obtenidos para FDN y FDA.

Tabla 12. Contenido de Fibra Detergente Neutro FDN.

| Ensayos | Masa Muestra (g) | Masa del Residuo (g) | Masa de cenizas (g) | % Fibra Detergente Neutra (FDN) |
|------------|------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|
| 1 | 1.0010 | 0.5815 | 0.0028 | 57.81 |
| 2 | 1.0127 | 0.5743 | 0.0031 | 56.40 |
| 3 | 1.0913 | 0.5921 | 0.0029 | 54.13 |
| Blanco | 0 | 0.0001 | 0.0001 | ----- |
| PROMEDIO | 1.0350 | 0.5830 | 0.0029 | 56.11 |
| DESVIACION | 0.049 | 0.009 | 0.0002 | 1.52 |

$$\%FDN = \frac{P_1 - P_2 - B}{M} \times 100$$

P1: masa residuo seco, P2: masa cenizas, B: masa blanco, M: masa de la muestra

Tabla 13. Contenido de Fibra Detergente Acido FDA.

| Ensayos | masa muestra (g) | masa FDA (g) | % FDA |
|------------|------------------|--------------|-------|
| 1 | 1.0145 | 0.5149 | 50.75 |
| 2 | 1.0931 | 0.5318 | 48.65 |
| 3 | 1.0351 | 0.5239 | 49.97 |
| PROMEDIO | 1.0476 | 0.5235 | 49.79 |
| DESVIACION | 0.0136 | 0.00069 | 0.867 |

$$\% FDA = \frac{P}{M} \times 100$$

P: masa FDA, M: masa muestra

Tabla 14. Porcentaje de Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Acida (FDA)

| Ensayos | (FDN) % | FDA % |
|-------------------|--------------|--------------|
| 1 | 57.81 | 50.75 |
| 2 | 56.40 | 48.65 |
| 3 | 54.13 | 49.97 |
| PROMEDIO | 56.11 | 49.79 |
| DESVIACION | 1.52 | 0.867 |

Tabla 15. La determinación de lignina.

| Ensayos | M (g) | P ₁ (g) | P ₂ (g) | % Lignina |
|-------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| 1 | 0.5149 | 0.3086 | 0,00039 | 30.38 |
| 2 | 0.5318 | 0.3946 | 0.00055 | 36.05 |
| 3 | 0.5239 | 0.3190 | 0,00037 | 30.78 |
| Blanco | 0 | 0.0003 | 0.0000 | 0.00 |
| PROMEDIO | 0.5235 | 0.3407 | 0.00044 | 32.4 |
| DESVIACION | 0.00069 | 0.05 | 0.0001 | 3.16 |

$$\% \text{ Lignina} = \frac{(P_1 - P_2 - B)}{M}$$

P₁: masa del residuo tratada con ácido sulfúrico al 72%, P₂: masa de cenizas, B: blanco, M: masa muestra

El contenido de FDN en la cascarilla de cacao analizada en este estudio (56.11%) fue similar a los resultados reportado por otros estudios (59.78%) [6] con cascarilla de origen industrial, que es mezcla de materias primas diferentes variedades de cacao [11]. Una observación importante, del proceso de extracción de la FDN en este estudio fue que el color característico de la cascarilla de cacao no cambio (figura 31) lo que lleva a pensar en la presencia de taninos fuertemente ligados a la fibra lo que perjudicaría la digestibilidad de esta [76].

El valor promedio de FDA de la cascarilla de cacao encontrada en este estudio (49,79%), fue similar a reportes dados por otros autores (47.04%) con cascarilla de origen industrial [6]. Al igual que en la extracción de FDN, la fibra no perdió su coloración, al contrario la solución resultante se tornó de una coloración más intensa (figura 32). El color café y morado en el cacao se atribuye a una alteración compleja entre catequinas y taninos [12]. La presencia de algunos taninos en la fibra dietara tienen efectos nutricionales adversos en los organismos, porque

pueden provocar una inhibición microbiana y enzimática. También forman complejos con las membranas de las mucosas, pero algunos de estos compuestos pueden ser beneficiosos para los rumiantes, aunque el consumo prolongado de alimentos que contengan este tipo de compuestos puede generar problemas en el tracto digestivo de estos animales [12, 77, 78].

Tabla 16. Composición química de la cascarilla de *Theobroma cacao L.* (Porcentaje BS)

| Ensayo | Lignina % | Celulosa % | Hemicelulosa % | Pectinas % |
|-------------------|-------------|--------------|----------------|--------------|
| 1 | 30.38 | 20.37 | 7.06 | 18.69 |
| 2 | 36.05 | 12.60 | 7.75 | 24.99 |
| 3 | 30.78 | 19.19 | 4.34 | 15.18 |
| PROMEDIO | 32.4 | 17.39 | 6.38 | 19.62 |
| DESVIACION | 3.16 | 3.42 | 1.47 | 4.06 |

$$\%Celulosa = FDA - lignina; \%Hemicelulosa = FDN - FDA; \%pectinas = FDT - FDN$$

El contenido de lignina se determinó partiendo de la masa de FDA, en la Tabla 15 se observan los resultados para la determinación de lignina.

Como se aprecia en la tabla 16 el contenido de lignina en la cascarilla de cacao subproducto de la industria presentó un valor superior al reportado por otros estudios realizados a una fuente similar procedente de una industria (21.16%) [6]. Es importante destacar que el contenido de lignina en los materiales vegetales aumenta con el tiempo de maduración. Altos contenidos de lignina afectan de manera inversamente proporcional a la digestibilidad de la fibra [76, 79].

A partir de los valores de FDN, FDA y lignina se calcularon los contenidos de celulosa, hemicelulosa de la cascarilla de cacao analizada en este estudio (Ver tabla 14 y 15), los resultados se presentan en la tabla 16.

La dispersión en los datos puede deberse al contenido de lignina, que hace que se entrelace con los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), impidiendo una correcta cuantificación de estos [6, 76].

El contenido de celulosa encontrado (17.39%) está por debajo de los valores reportados por otros autores para cascarilla (26.15%), procedente de la industria

[6]. Con relación a otras fuentes naturales de fibra empleadas en alimentación animal se tiene que la morera aporta 19.35% de celulosa [80]; algunas leguminosas entre 31-35%. En general, verduras, frutas, leguminosas, frutos secos y cereales aportan cantidades importantes de celulosa [47].

El contenido total de Hemicelulosa (ver tabla 16) fue inferior al reportado por otros estudios en cascarilla de cacao originaria de la industria (12.75%) [6]. Sin embargo, otras investigaciones han reportado valores de 5.35% para cacao forastero [11]. Además, existen estudios donde el análisis de hemicelulosa, se hace por fraccionamiento de sus monosacáridos [75].

El contenido de pectinas se calculó con base en la FDT y FDN (ver Tabla 11 y 14), los resultados se presentan en la tabla 16, el valor promedio obtenido fue 19.62% con una desviación estándar mayor a 1, esta dispersión en los valores puede deberse al método indirecto empleado y la materia prima que es heterogénea. El valor obtenido para pectinas en este estudio se encuentra en el intervalo (12.5%-45%) de resultados de otras investigaciones para cacao forastero [11, 75]. Este contenido de pectinas se considera bueno comparado con fuentes de pectinas comerciales como la manzana para la que se reporta un contenido entre 15% y 18%, y para cítricos del 25%. Las pectinas en la fibra son importantes porque ayudan a regular los niveles de glucosa en el organismo animal. Una concentración alta de pectinas es beneficiosa para la capacidad de retención de agua, aceite e hinchamiento de la fibra, además de sus grandes aplicaciones en la industria alimenticia [81].

7.3 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA FIBRA DIETARÍA TOTAL DE CASCARILLA de *Theobroma cacao L.*

En el ANEXO 8 se encuentran las ecuaciones empleadas para calcular las propiedades funcionales, y en La tabla 17 se muestra los resultados para los diferentes análisis que se realizaron en este estudio.

Tabla 17. Propiedades funcionales de fibra dietaría obtenida de la cascarilla de cacao de *Theobroma cacao L.*

| (CRA) (g H ₂ O/g MS) | (CH) (mLH ₂ O/gMS) | (CRAc) (g/g) | (CIC) (meqH ⁺ /g) |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| 7.6±0.91 | 5.7±0.02 | 2.1±0.23 | 7.5±0.51 |

Capacidad de Retención de Agua (CRA), Capacidad de Hinchamiento (CH), Capacidad de Retención de Aceite (CRAc), Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).

Según los resultados, la CRA (7.6g H₂O/g MS) encontrada es superior a la reportada por otros estudios realizados en cascarilla de cacao (4.76-3.62 g H₂O/g MS) [82], al igual que para estudios de otras fuentes de fibra (5.8 gH₂O/g MS en café, 1,6 g H₂O/g MS en manzana y 1,65 g H₂O/g MS en naranja) [9, 73, 74]. Aun así es baja, dado que una alta capacidad de retención de agua oscila entre 10-12 g/g [9] de esta propiedad depende el efecto fisiológico de la fibra, donde componentes como la lignina le confiere un medio hidrofóbico [76], impidiendo el nivel de incorporación máximo a un alimento, también se afecta la viscosidad de los productos facilitando o dificultando su procesamiento. Los principales factores que influyen en la capacidad de retención de agua, en la fibra se encuentran el tamaño de partícula, pH, fuerza iónica, porosidad, capilaridad y tipo de estructura de las fibras que son específicas de cada compuesto [9, 46].

La CH de la fibra dietaria obtenida (5.7mL H₂O/g MS) fue superior a la CH reportada para cacao forastero (3.87mL/g) [9]. Las características y composición química de la fibra juegan papeles importantes en la cinética de absorción de agua [73]. Fuentes de fibra como el limón fino tiene una CH de 9.19mL/g y la uva de 8.2mL/g [73], siendo estos resultados superiores a los obtenidos en fibra de cascarilla de cacao. Es importante resaltar que las fuentes de fibra mencionadas poseen altos contenidos de fibra soluble, la cual hace que las fibras aumente su Capacidad de Hinchamiento [83].

La CRAc (2.1 g/g) arrojó resultados similares a los reportados por otros estudios para cascarilla de cacao forastero (3.3 g/g) [11]. La CRAc es mayor en fibras que tienen alto contenido de fibra insoluble, debido a que las moléculas son atrapadas en su mayoría gracias al tamaño de las moléculas de la fibra [46]. Fuentes de fibra dietaria como manzana y limón fino reportan una CRAc de 0.95g/g y 1.48g/g respectivamente; valores muy inferiores al de este estudio y que pueden estar relacionados con la baja cantidad de fibra insoluble que estas fuentes poseen [73].

El resultado obtenido de la CIC en este estudio (7.5meqH⁺/g), comparado con la capacidad de intercambio catiónico en hortalizas y cereales (0.5, 3.2 meqH⁺/g) [45], fue superior. No se encontró referentes bibliográficos de otros estudios a cascarilla de cacao para hacer la comparación; Pero se sabe que la CIC está ligada a la absorción de minerales y depende fundamentalmente del medio en el que este la fibra, por lo tanto, puede inducir un desequilibrio mineral del consumidor, además la fibra procedente de legumbres y Forrajes tiene una capacidad de intercambio catiónico elevada debido a la gran cantidad de ácidos urónicos que presenta [45, 46].

7.4 FERMENTACIÓN RUMINAL BACTERIANA *in vitro*

7.4.1 Caracterización del líquido ruminal.

En la tabla 18 se presentan las principales características físicas del líquido ruminal.

Tabla 18. Análisis físicos del líquido ruminal y sus principales características

| PROPIEDAD FISICA | CARACTERÍSTICAS |
|------------------|---|
| Color | Verdoso (ver figura 38) |
| Olor | Característico, fuerte y acorde a materia fecal |
| Aspecto | Líquida con partículas en suspensión |
| pH | 7.81 |



Figura 38. Líquido ruminal filtrado.

Fuente: autoras

7.4.2 Proceso de fermentación

En la figura 39 se muestra el proceso llevado a cabo en medio anaerobio, temperatura controlada (39°C), tiempo de fermentación no superior a las 72h, impidiendo fuga de gases producto de la fermentación. Se hizo el montaje de dos reactores uno con fibra soluble y el otro con fibra insoluble.



Figura 39. Montaje del ensayo de Fermentación *in vitro*

7.4.2.1 Fracción de fibra soluble y fibra insoluble fermentada.

La tabla 19 muestra la cantidad de fibra soluble e insoluble que sufrió proceso de fermentación y el porcentaje de fibra digerida en ambos casos.

Tabla 19. Porcentaje digerido de Fibra Soluble (FS) y Fibra Insoluble (FI) de la cascarilla de cacao por fermentación ruminal.

| | m inicial (g) | m final (g) | Porcentaje Sin digerir | Porcentaje Digerido |
|-----------|--------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| FS | 4,882 | 0,2525 | 51,72 | 48,28 |
| FI | 4,993 | 0,4550 | 91,13 | 8,87 |

Como se observa en la tabla 19 la FI digerida fue 40% menor que la FS, indicando que la fibra soluble es más susceptible a la degradación por microorganismos. La fermentabilidad está bastante relacionada con la solubilidad de cada fibra, esta propiedad es probablemente la más importante de un gran número de fibras, ya que de ella derivan multitud de efectos, tanto locales como sistémicos [46]. Aunque el líquido ruminal contiene gran variedad de microorganismos según otros autores los más comunes son cocos y bacilos (ver ANEXO 4), los cuales según estudios son capaces de degradar celulosa y hemicelulosa [35], presentes en la fibra insoluble, el bajo porcentaje de degradabilidad obtenido (8,87%) comparado con la fibra soluble, podría deberse a

la inhibición enzimática causada por el alto contenido de lignina en la fibra Dietaría [6, 79] ya que el contenido de lignina en la fibra dietaría ha sido correlacionado con una reducción en la degradabilidad de esta y la concentración *in vitro* de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) [76, 79]. Sin embargo, a la FI se le han atribuido propiedades beneficiosas para salud humana, puesto que absorbe agua, estimula el tránsito intestinal y ayuda a movilizar más rápidamente fuera del organismo sustancias, confiriéndole un mayor efecto laxante y regulador intestinal, por su capacidad de aumentar la velocidad de tránsito intestinal [46]. Además La cascarilla de cacao por su alto contenido de fibra dietaría ya ha sido utilizada en estudios para evaluar el efecto de un suplemento alimenticio rico en fibra dietaría en niños con problemas de tránsito intestinal [84].

7.4.2.2 Análisis de Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

7.4.2.2.1 Análisis cualitativo de Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

En las figuras 40, 41 y 42, se presentan los cromatogramas de los estándares de Acido Acético, Propiónico y Butírico, que como se aprecia en el cromatograma con base en estudios previos son los ácidos mayoritarios en la fermentación ruminal [70]. Como se observa en los cromatogramas en cada caso se obtuvieron picos resueltos con tiempos de retención bien diferenciados.

En las figuras 43 y 44 se presentan los resultados de la muestras del producto de fermentación para FI y FS, encontrándose ácido acético, propiónico y butírico para fibra soluble y en la FI solamente ácido acético siendo el compuesto mayoritario en ambos casos. Estos resultados coinciden con los reportados en otros análisis de fermentación ruminal *in-vitro*, quienes reportan los mismos compuestos con orden de elución similar [70, 85].

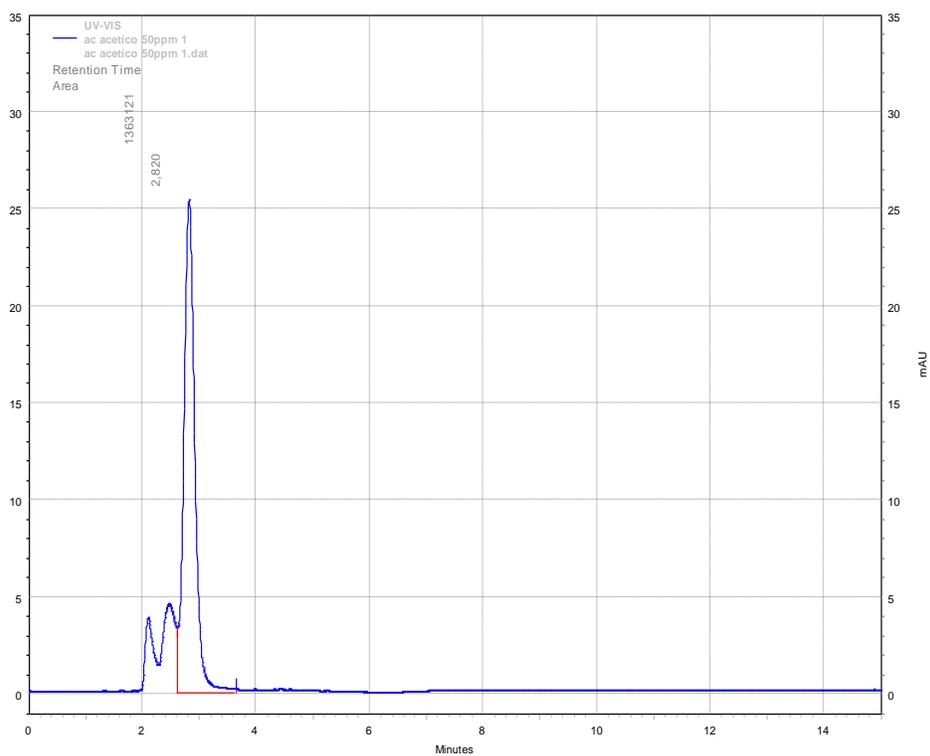


Figura 40. Cromatograma del ácido acético.

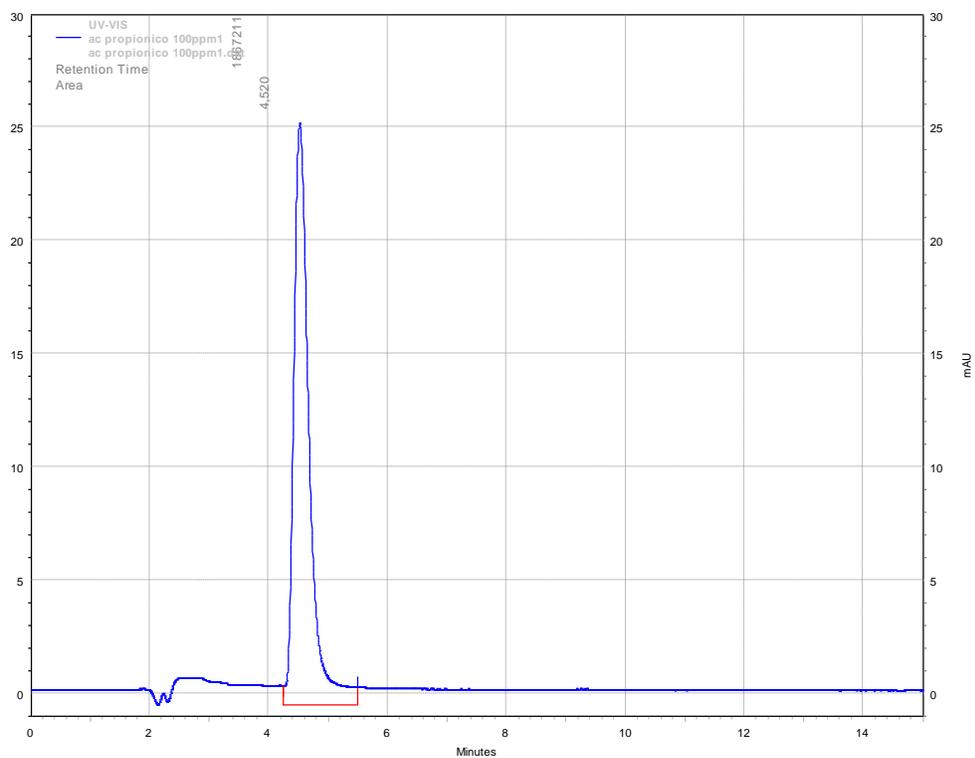


Figura 41. Cromatograma del ácido propiónico.

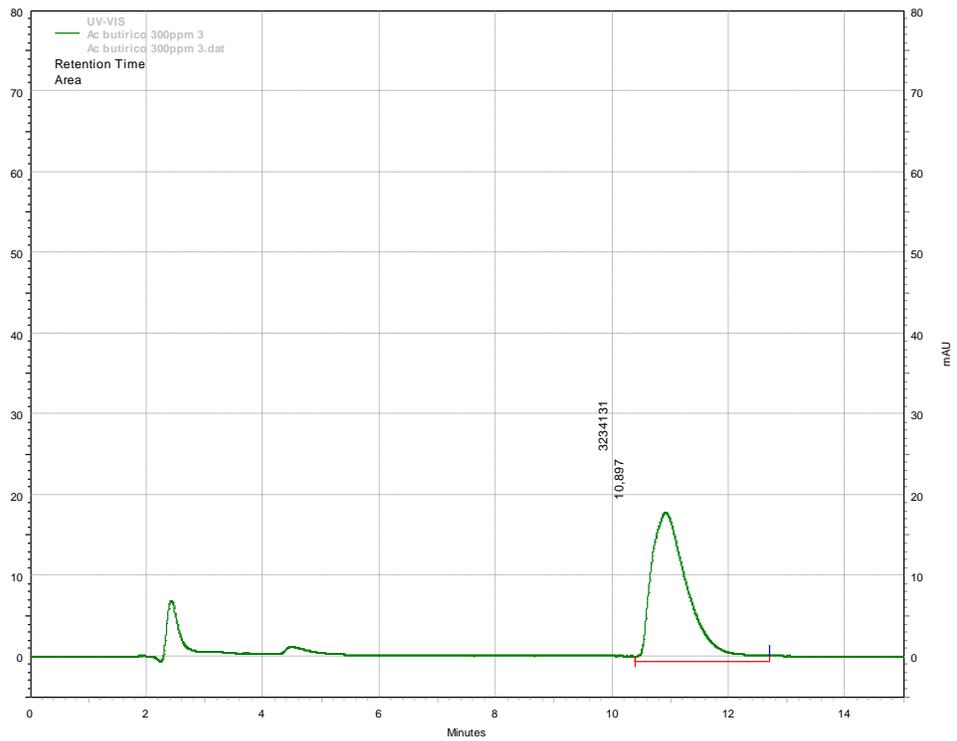


Figura 42. Cromatograma del ácido butírico.

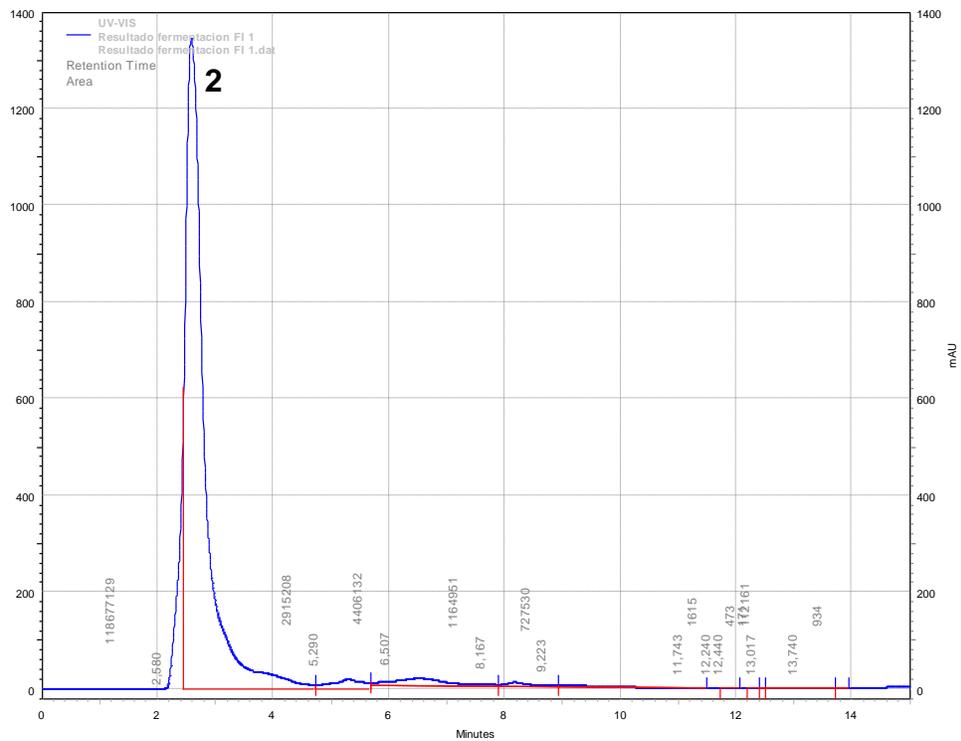


Figura 43. Cromatograma del producto de la fermentación de fibra insoluble de la cascavilla de *Theobroma cacao L.*

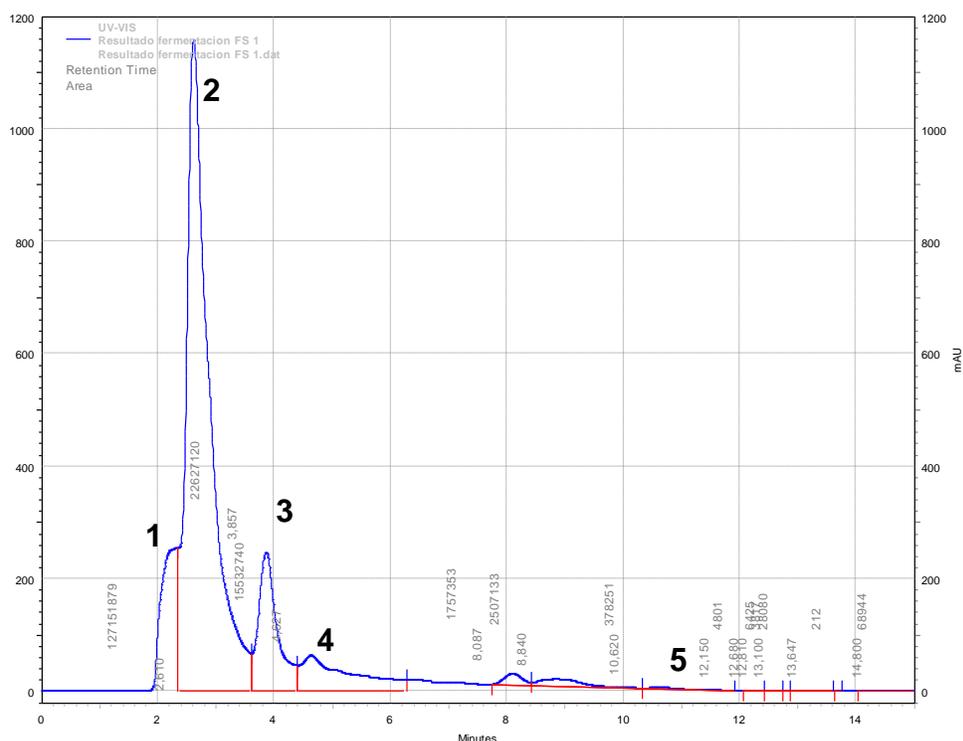


Figura 44. Cromatograma de los productos de fermentación ruminal de a fibra soluble de la cascarilla de *Theobroma cacao L.*

Como se aprecia en el cromatograma de la figura 44 se encontraron 5 picos, de los cuales según los estándares corresponde a Ácido acético (tr. 2.6min), Acido propiónico (tr. 4.6min) y ácido butírico (tr. 10.6min). Los que aparecen junto al pico de ácido acético con tiempos de retención de 2,2 y 3,8 minutos posiblemente correspondan a ácido láctico y succínico respectivamente, teniendo en cuenta los productos de fermentación ruminal mencionados por otros autores(ver ANEXO 4) así como los ácidos identificados en otros artículos con sistemas de separación similares en C18 donde se han identificado esos ácidos grasos [86-88]

7.4.2.2.2 Análisis cuantitativo

Las condiciones de separación fueron tomadas del estudio comparativo del contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera* [89], y se hizo la curva de calibración específica para los ácidos grasos que se cuantificaron.

El análisis cuantitativo de los ácidos grasos volátiles, se realizo por el método del estándar externo, empleando ácido propiónico como estándar para la cuantificación de los ácidos grasos volátiles. La curva de calibración se hizo con

concentraciones entre 20 y 500ppm, la ecuación de la curva obtenida fue $y=14945x + 481483$ con un coeficiente de correlación del 0,9977 (Anexo 9), que indica una buena linealidad, los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) fueron de 1,11 y 0,99ppm respectivamente, los resultados de la cuantificación de los ácidos grasos en los productos de fermentación de la FI y FS, se presentan en la tabla 20.

Tabla 20. Ácidos grasos obtenidos en la fermentación con la fibra dietaria.

| | t_r min | PFFI | PFFS |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Concentración (mg/L) | Concentración (mg/L) |
| Compuesto 1 | 2,2 | ND | NC |
| Compuesto 2 (Ac. acético) | 2.6 | 7786,65 | 7863,65 |
| | | 8139,51 | 7671,28 |
| | | 8470,16 | ----- |
| Promedio | | 8132,11 | 7767,47 |
| Desviación | | 341,82 | 136,02 |
| Compuesto 3 | 3.86 | ND | NC |
| Compuesto 4 (Ac. Propiónico) | 4.6 | ND | 627,26 |
| | | ND | 612,91 |
| Promedio | ----- | ----- | 620,08 |
| Desviación | ----- | ----- | 10,14 |
| Compuesto 5 (Ac. Butírico) | 10.6 | ND | NC |

PFFI: Producto de Fermentación Fibra Insoluble, PFFS: Producto de Fermentación Fibra Soluble
 ND: No Detectado, NC: Indeterminado

En la tabla 20 se encuentran las concentraciones para los productos de fermentación. el ácido acético se detectó en los dos productos de fermentación, obteniéndose una mayor concentración en el producto de fermentación de FI, el ácido propiónico al igual que el ácido butírico solo se detectan en el producto de fermentación de FS, la presencia de estos ácidos confirma que se da la fermentación, por lo tanto la fibra dietaria sufre degradación, además estos productos de fermentación coinciden con los reportados con análisis realizados a otras fuentes de fibras donde el ácido acético se encuentra en mayor proporción seguido por el ácido propiónico y en menor proporción el ácido butírico [70, 85].

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se pudo obtener la fibra dietaria de la cascarilla de cacao por el método de hidrólisis enzimática, encontrándose un contenido de FDT (76%), con una relación FI /FS de 8:1, lo que indica que podría ser aprovechada por la industria para la elaboración de alimentos ricos en fibra.
- La composición química de la cascarilla de cacao estudiada arrojó valores de celulosa (17.39%), Hemicelulosa (6.38%), pectinas (19.62%) y lignina (32.4%), el contenido de pectinas se encuentra dentro del intervalo (12.5 - 45%), lo que convierte en una posible fuente de pectinas de uso industrial y comercial.
- Los valores de las propiedades funcionales evaluadas a la fibra dietaria obtenida en este estudio fueron para Capacidad de Retención Agua (7.6gH₂O/gMS), Capacidad de Hinchamiento (5.7 mLH₂O/gMS), Capacidad de Intercambio Catiónico (7.5 meqH⁺/g), y la Capacidad de Retención de Aceite (2.1g/g), los cuales están dentro de los valores reportados para fibras dietarias comerciales
- El proceso de fermentación ruminal *in-vitro* mostró que la FS obtenida de la cascarilla de cacao tiene una mayor susceptibilidad a ser degradada por los microorganismos que la fibra insoluble. La identificación y cuantificación de los ácidos grasos volátiles producto de la fermentación ruminal *in-vitro* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia fue eficiente para la identificación de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico y la cuantificación de ácido acético y ácido propiónico.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de composición proximal de la cascarilla de cacao y comparar con los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática para verificar la efectividad del método.
- Realizar la determinación de fibra soluble y fibra insoluble, implementando otras metodologías y hacer la comparación de los resultados con la metodología implementada en este estudio.
- Determinar la composición de la celulosa y hemicelulosa por métodos directos y hacer la comparación con los resultados de este estudio.
- Realizar un estudio de pectinas para este tipo de residuos de forma que se pueda ampliar la información del contenido de estas en la fibra dietaria, contribuyendo a su uso potencial.
- Se debe hacer un estudio del contenido de taninos y polifenoles, para determinar su efecto sobre la degradabilidad tanto *in-vitro* como *in-vivo* de la fibra dietaria de la cascarilla de cacao.
- Ampliar el estudio de las propiedades de la fibra dietaria de la cascarilla de cacao tales como: viscosidad, capacidad de emulsificación, absorción *in-vitro* de ácidos biliares y retención de glucosa.
- Realizar una fermentación *in-vitro* de la fibra de la cascarilla de cacao donde se mejoren las condiciones del proceso, con repetibilidad que permita realizar el análisis estadístico del método.
- Hacer el seguimiento de microorganismos en el proceso de fermentación ruminal *in-vitro*.
- Estandarizar una metodología para el análisis de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases y compáralo con el método de cromatografía líquida de alta eficiencia usado en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. VELÁSQUEZ, Jorge A.; Giraldo, Paula A., POSIBILIDADES COMPETITIVAS DE PRODUCTOS PRIORITARIOS DE ANTIOQUIA FRENTE A LOS ACUERDOS DE INTEGRACIÓN Y NUEVOS ACUERDOS COMERCIALES Medellín, Gobernacion de Antioquia Marzo 2005.
- [2]. PRADO N, Melba; MENDOZA A, Isidro,, Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestales Programa para el Desarrollo Rural Sostenible en el Municipio El Castillo, Río San Juan, Nicaragua. ProDeSoc, pp. 13-5. 2006.
- [3]. ANTIOQUIA Territorio de Innovación Oportunidades para el desarrollo. ed. Gobernacion de Antioquia. Medellín
- [4]. Agroindustria y competitividad Observatorio agrocadenas.Ministerio de agricultura y desarrollo; IICA Anuario 2005.
- [5]. Dr. Ayeni, L.S. (Ph.D. Soil Science), Effect of Combined Cocoa Pod Ash and NPK Fertilizer on Soil Properties, Nutrient Uptake and Yield of Maize (*Zea mays*) Journal of American Science 6(3), pp. 79-84. 2010.
- [6]. ALEMAWOR Francis, DZOGBEFIA Victoria P., ODDOYE Emmanuel O.K., OLDHAM James H., Enzyme cocktail for enhancing poultry utilisation of cocoa pod husk Scientific Research and Essay Vol. 4 (6) pp. 555-9. June 2009.
- [7]. BARAZARTE, Humberto; SANGRONIS, Elba; UNAI, Emaldi, La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas LATINOAMERICANOS DE NUTRICION Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición Vol. 58 N° 1, 2008, pp. 64-70. 2008.
- [8]. CRUZ Gerardo, PIRILÄ Minna, HUUHTANEN Mika, CARRIÓN Lili, ALVARENGA Emilio, KEISKI Riitta L. , Production of Activated Carbon from Cocoa (*Theobroma cacao*) Pod Husk Civil & Environmental Engineering 2:109. 2012.
- [9]. ABARCA R., Diego Hernán. IDENTIFICACION DE FIBRA DIETARIA EN RESIDUOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDAD Complejo nacional por trinitario. ESCUELA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS ÁREA BIOLÓGICA. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA, LOJA – ECUADOR. 2010.
- [10]. MURILLO C. Iveth, MSc. QUILAMBAQUI J. Miguel. Evaluación de 2 Dietas Experimentales con Diferentes Niveles de Cascarilla de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en las Fases de Crecimiento y Acabado de Cuyes (*Cavia porcellus* L.) de Raza Andina. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador.
- [11]. YOUNG, Lee; SUK, Lee Jung; IKBOO, Kwon. Cacao extract including dietary fiber. Patent No. WO0062631. 2000

- [12]. CUÉLLAR G, Oscar A. Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana. Investigación. Escuela de Química. Universidad Tecnológica Pereira Pereira. 2010, pp. 134.
- [13]. YÉPEZ G, Mercy Katiuzca; VILLEGAS A, Eliana Valeria. Análisis de factibilidad para la creación de una procesadora de cacao en la ciudad de milagro Universidad Estatal de Milagro, Milagro-Ecuador. 2012, pp. 162.
- [14]. PADRÓN G, Gabriela; ARIAS M, Eduardo M; Romero G, Jorge; BENAVIDES M, Adalberto; ZAMORA R, Josefina; GARCÍA R, Sandra P., Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola. Propiedades físicas y de biodegradabilidad Rev. Soc. Quím. Méx. 2004., pp. 156-64. 2004.
- [15]. SARTINI M, Natsir Djide; GEMINI, Alam, Effect of cocoa pod husk extracts on prevention of hypercholesterolemia in albino rat (*Rattus novergicus*) Majalah Farmasi dan Farmakologi Vol. 12, No. 3, pp. 79-82. noviembre, 2008.
- [16]. JAIMES S., Yeirme; ARANZAZU H., Fabio Manejo de las enfermedades del cacao (*theobroma cacao L.*) en colombia, con énfasis en monilia (*moniliophthora roreri*) Colombia. Corpoica 2010. pp. 90.
- [17]. OLIVARES S, Juan M., Elaboración del chocolate, una tecnica dulce y ecologica Tecnica Industrial 268 / Marzo - Abril 2007. 2007.
- [18]. CASTELLANOS D., Oscar F.; TORRES P., Luz M; FONSECA R, Sandra L.; MONTAÑEZ F, Victor M.; SANCHEZ V., Adriana, Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de Cacao-chocolate en Colombia Bogota, productividad y competitividad biogestión universidad nacional de Colombia Grupo de investigación y desarrollo en gestión. Ministerio de agricultura, Universidad Nacional de Colombia, Instituto para el desarrollo de la ciencia y la tecnologia "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS. 2007.
- [19]. BATISTA, Lépidio, Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana. CEDAF. In Guía Técnica, editorial Ingráfica C. por A. Santo Domingo, República Dominicana. 2009.
- [20]. IICA, Protocolo estandarización de oferta para el cultivo del cacao en el Perú Lima, 2006. pp. 73.
- [21]. EGAS Y, Juan José. Efecto de la inoculación con *Azotobacter sp.* En el crecimiento de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao L.*), genotipo nacional, en la provincia de Esmeralda. Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional, Quito. 2010.
- [22]. *Theobroma cacao* Species Plantarum 2, pp. 253-8.
- [23]. CHACÓN de R, I; RAMIS, C.; GÓMEZ, C., Descripción morfológica de frutos y semillas del cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao L.*) en el Sur del Lago de Maracaibo Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2011, 28 Supl. 1: , pp. 1-13. 2011.

- [24]. VOS, Janny G. M., RITCHIE, Barbara J., FLOOD, Julie., Descubriendo y aprendiendo acerca del Cacao CABI Bioscience. 2003.
- [25]. MARTÍNEZ, Alis; NARVÁEZ, Zurhilma; SPINELLI, Gustavo, Mosquitas polinizadoras (Diptera: Ceratopogonidae) del cacao colectadas en comunidades Piara en Amazonas, Venezuela, Bol Entomol Venez 15(2), pp. 249-53. Diciembre 2000.
- [26]. KALVATCHEV, Zlatko; GARZARO, Domingo; GUERRA C, Franklin. , *Theobroma Cacao L.*: Un nuevo enfoque para nutrición y salud AGROALIMENTARIA. 1998.
- [27]. PRAKASH H, H. C. Bittenbender; O'DOHERTY, Daniel. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for CACAO (*Theobroma cacao*). pp. 23
- [28]. QUINTERO R, María Liliana; DIAZ M, Katty Marisabel El mercado mundial de Cacao AGROALIMENTARIA. Nº 18. Enero-Junio 2004, pp. 47-59. 2004.
- [29]. RIGEL J., Liendo., Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos Tecnología postcosecha INIA divulga 6 septiembre-diciembre 2005, pp. 2-4. 2005.
- [30]. Mojica P., Amilcar; Paredes V., Joaquín, Características del cultivo del cacao en Santander Bucaramanga. Centro Regional de Estudios Económicos 2006. pp. 38.
- [31]. rural, Ministerio de Agricultura y Desarrollo, "Implementación de 112 hectáreas en sistema agroforestal cacao-matarraton maderable como medida de reactivación del sector y alternativa de producción para 56 pequeños productores en el municipio de un guía-chocó" Comisión Intersectorial Ago. 24 / 06. 2006.
- [32]. ESPINAL G., Carlos F.; MARTÍNEZ C., Héctor J.; ORTIZ H, Lilia. , La cadena del cacao en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005 Bogotá. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia ESPINAL G., Carlos F.; MARTÍNEZ C., Héctor J.; ORTIZ H, Lilia. .
- [33]. GOMEZ R., Luis A.; CALDERON T, WILLIAM "Alianza productiva de cacao" Ubicación: municipios de Belalcazar y San José en el departamento de Caldas. Fundacion CODESARROLLO; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Apoyo Alianzas Productivas. Junio 2007. pp. 211.
- [34]. TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo, Fisiología vegetal. 3rd Ed. , Vol. 2 editorial Publicaciones de la Universidad Jaime I. Castello de la Plana-España. 2006.
- [35]. GUERRERO C., Ana Carolina. "Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de celulosa". Investigacion. Ingenieria ambiental. Universidad Politécnica Salesians sede Cuenca, Cuenca. Mayo de 2011.
- [36]. ALONSO P., José Ramón Manual de histología vegetal. editorial Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-España. 2011.
- [37]. RODRIGUEZ, Rocio; JIMENEZ Ana; FERNANDEZ B., Juan; GUILLEN, Rafael and HEREDIA, Antonia., Fibra alimentaria. editorial S.A. RAYCAR. Madrid-España. 2003.

- [38]. ANDRADE Y., Álvaro Santiago; RIVADENEIRA V., José Luis. "Determinación de los parámetros óptimos en la elaboración de vino de miel de abeja, utilizando dos tipos de aglutinantes naturales, mucílago de cadillo negro (*triumfetta lappula l.*) Y mucílago de nopal (*opuntia ficus indica*), como clarificantes". Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE, , Ibarra – Ecuador. 2010.
- [39]. CANO S., Iván; CAPETILLO R., Maholí.; CARDENAS C., Mariana; CARRILLO G., Raúl; CARTES L., Daniel Rol de la fibra dietaria en animales no rumiantes. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, Chile. 2011.
- [40]. ZIEGLER, Ekhard E., FILER, L.J, Conocimientos actuales sobre nutrición. 7ª ed. , editorial Copublicacion Organización Panamericana de la Salud e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida. Washington D.C. 1997.
- [41]. GIL H., Angel, Tratado de nutrición 2ª ed. , Tomo I editorial Medica Panamericana. Madrid-España. 2010.
- [42]. RODRIGUEZ, Rocio; JIMENEZ ANA; FERNANDEZ B., Juan; GUILLEN, Rafael and HEREDIA, Antonia., Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients.
- [43]. ZÚÑIGA M., María Cecilia. Caracterización de fibra dietaría en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Escuela de agronomía, facultad de ciencias agronómicas. Universidad de Chile, Santiago-Chile. 2005, pp. 68
- [44]. McCLEARY, Barry V.; PROSKY, Leon. , Advanced Dietary Fibre Technology., editorial. Hoboken, NJ, USA Wiley-Blackwell. 2008.
- [45]. RAMIREZ, A, PACHECO de D, Emperatriz., Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietetica obtenidas de piña, guayaba, y guanabana. INTERCIENCIA Vol. 34 N° 4, pp. 293-8. 2009.
- [46]. MATOS Chamorro, Alfredo; CHAMBILLA Mamani, Elmer, Importancia de la Fibra Dietética, sus Propiedades Funcionales en la Alimentación Humana y en la Industria Alimentaria Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos Vol. 1, N° 1, 2010, pp. 4-17. 2010.
- [47]. MATAIX V., José; GASSUL, M. A.; , Fibra alimentaria., editorial. Ergon. Madrid: Mataix J (ed.): Nutrición y alimentación humana. . 2002.
- [48]. CHOJNACKA, K. Fermentation products. In Chemical engineering and chemical process technology, pp. 12
- [49]. MACFADDIN, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3rd Ed. , editorial Medica Panamericana. Buenos Aires-Argentina: RONDINONE, Silvia; GIOVANNIELLO, Octavio. 2003.
- [50]. GARCÍA P., P.; BRETÓN L., I.; de la CUERDA C., C.; CAMBLOR A., M.; Metabolismo colónico de la fibra. Nutrición Hospitalaria Vol. XVII, pp. 11-6. 2002.
- [51]. RODRIGUEZ C, Abner A.; VALENCIA C, Elide., Microbiología Ruminal RUMINANTIA una publicación dirigida a Productores de Pequeños Rumiantes en Puerto Rico Vol :3, No 1, 2008, pp. 4. 2008.

- [52]. CALSAMIGLIA, Sergio; CASTILLEJOS, Lorena; BUSQUET, Marta., Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno XXI CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, pp. 161-85. Madrid, 7 y 8 de Noviembre de 2005.
- [53]. VAN LIER, Elize; REGUEIRO, Mariel., Digestion en reticulo-rumen. In Departamento de producción animal y pasturas curso de anatomía y fisiología animal., editorial. Montevideo: Facultad de agronomía Universidad de la Republica. 2008.
- [54]. MATEOS, Inmaculada; CEDIEL, Aparicio. Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales comparacion de metodologias para la caracterización de la fibra alimentaria. Tesis Doctoral. Facultad de farmacia. Universidad Complutense de Madrid., Madrid. 2008, pp. 254.
- [55]. KAMANDE, George M.; MILLS, Diamond V.;. 2006. Digestión ruminal y nutrición, Congreso de Forrajes.Producir XXI
- [56]. ANGULO, R. A.; NOGUERA, R.R.; BERDUGO, J.A., El búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) un eficiente utilizador de nutrientes: aspectos sobre fermentación y digestión ruminal. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. #67. Retrieved August 17. 2012.
- [57]. GALINDO, Juana; MARRERO, Yoandra., Manipulación de la fermentación microbiana ruminal *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. vol. 39, 2005, pp. pp. 439-50. 2005.
- [58]. CALSAMIGLIA, S.; FERREY, A. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo, XVIII Curso de especialización FEDNA, Barcelona, 4 y 5 de Noviembre de 2002.
- [59]. CID J. , HERNÁNDEZ F., MADRID J. , MEGÍAS M.D., ORENCO J. , EFECTO DE LA RACIÓN DE LOS ANIMALES DONANTES DE LÍQUIDO RUMINAL SOBRE LA DEGRADABILIDAD IN VITRO DE PAJAS Y SUBPRODUCTO DE LIMÓN AN. VET. (MURCIA) 19, pp. 7-14. 2003.
- [60]. GUADARRAMA, Andrea; OROZCO Juan; MORALES, Macario, Obtención de α -amilasa a partir de *Aspergillus oryzae* XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- [61]. Manuel, AGEITOS M. José. Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de *Bacillus licheniformis*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Departamento de microbiología y parasitología. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 2011.
- [62]. KOUKAB R, Ikram-ul-Haq; Hamad, Ashraf, Production of Amyloglucosidase by UV Irradiated Strain *Aspergillus Niger* Using Solid States Fermentation *Food Technology* Vol. 3 (1), pp. 68-71. 2005.
- [63]. SHAZIA M, Tehreema Iftikhar; Ikram UI Haq, Enhanced amyloglucosidase biosynthesis through mutagenesis using *Aspergillus Niger* *Pak. J Bot.* Vol 43 (1), pp. 111-9. 2011.
- [64]. SEGURA S, Freimar; ECHEVERRI F, Rosario; PATIÑO LI, Arley C; MEJÍA G., Amanda I., Descripción y discusión acerca de los métodos de

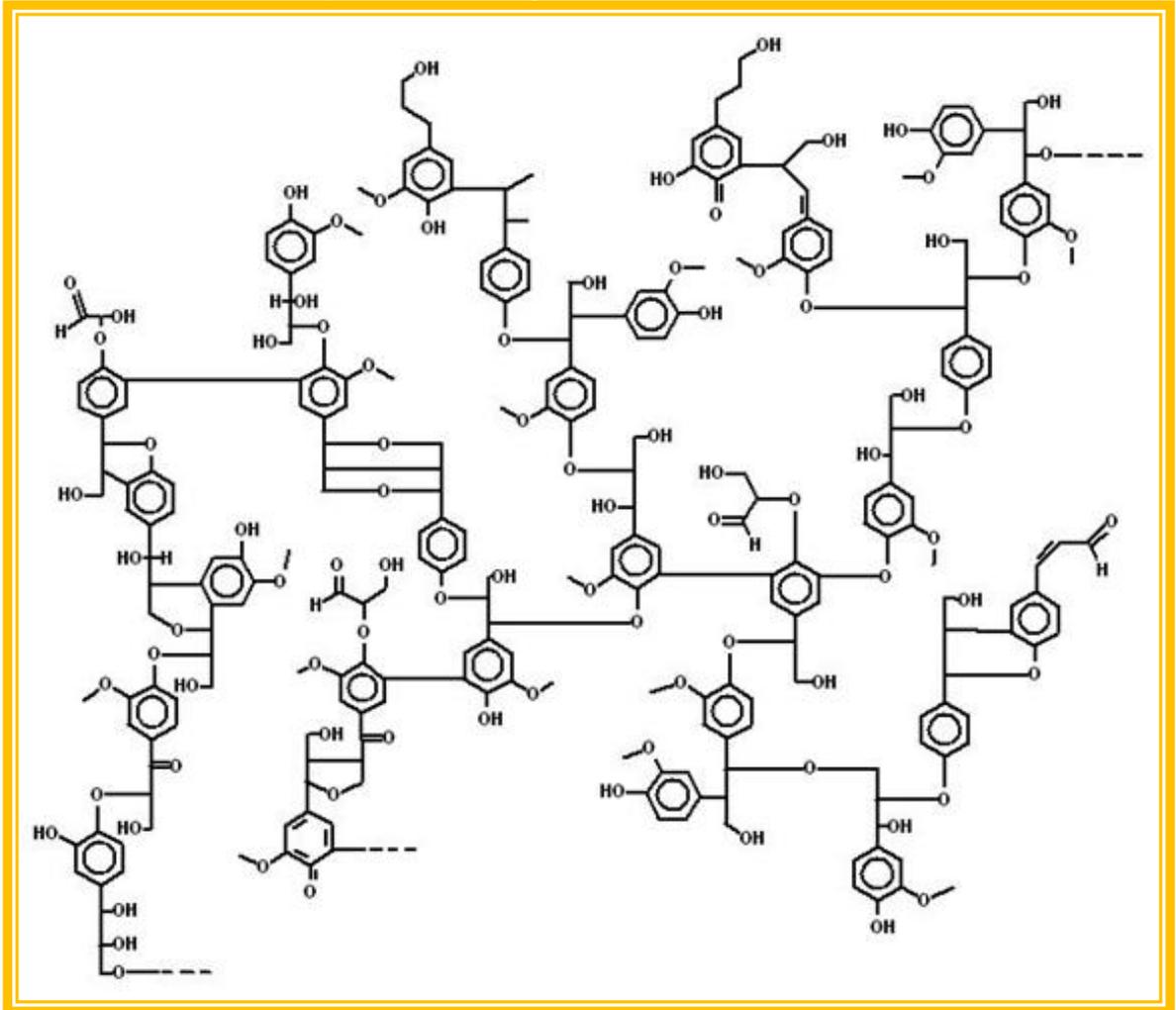
- análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Volumen 14 número 1, año 2007. , pp. 72-81. 2007.
- [65]. FONDEVILA, Manuel. Sistema sencillo de fermentación in vitro con flujo discontinuo de las fases líquida y sólida. España Patent No. nº P 200600043.
- [66]. BRUNI, M. de los A.; CHILIBROSTE P., Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2001. 9(1) pp. 43-51. 2001.
- [67]. QUATTROCCHI Oscar Alberto, ABELAIRA de andrizzi Sara Ines, LABA Raúl Felipe, Introducción a la HPLC aplicación y práctica. editorial Artes Gráficas Farro SA. Buenos Aires. 1992.
- [68]. Sigma-Aldrich. Total dietary fiber assay kit. In Product codes TDF-100A and TDF.C10 Technical Bulletin
- [69]. VALENCIA G., Francia E.; ROMÁN M., María O. , Caracterización fisicoquímica y funcional de tres concentrados comerciales de fibra dietaria VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Volumen 13 número 2, año 2006., pp. 54-60. 2006.
- [70]. CID, J.; HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; MEGÍAS, M.D.; ORENCO, J. , Efecto de la ración de los animales donantes de líquido Ruminante sobre la degradabilidad in vitro de pajas y Subproducto de limón AN. VET. (MURCIA) 19, pp. 7-14 2003.
- [71]. RAMOS, Sonia; MOULAY, Leila; GRANADO-SERRANO, Ana Belén; VILANOVA, Olga; MUGUERZA, Begoña; GOYA, Luis; BRAVO Laura., Hypolipidemic Effect in Cholesterol-Fed Rats of a Soluble Fiber-Rich Product Obtained from Cocoa Husks J. Agric. Food Chem. 56, pp. 6985-93. 2008.
- [72]. AGUILAR C, Paulina I. Modificación enzimática de la fibra dietaria de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao L*) variedad Complejo nacional por trinitario. Previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Universidad Técnica Particular De Loja LOJA-ECUADOR. 2011.
- [73]. FIGUEROLA, Fernando; HURTADO Maria L; ESTEVEZ Ana M; CHIFFELLE Italo; ASENJO, Fernando., Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. Food Chemistry Vol. 91, pp. 395-401. 2005
- [74]. ABARCA, D.; MARTÍNEZ, R.; MUÑOZ, J.; TORRES, M.; VARGAS, G., Residuos de Café, Cacao y Cladodio de Tuna: Fuentes Promisorias de Fibra Revista Tecnológica ESPOL – RTE, Vol. 23, N. 2, 63-69, , pp. 63-9. Noviembre, 2010.
- [75]. REDGWELL, R.; TROVATO, V.; MERINAT, S.; CURTI, D.; HEDIGER, S.; MANEZ, A., Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides Food Chemistry 81 (2003) pp. 103-12. 2002.

- [76]. RAMÍREZ O., Rafael; RAMÍREZ L., Roque G.; LÓPEZ G., Francisco., Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. Ciencia UANL Vol. V, número 002, pp. 180-9. 2002.
- [77]. LEYVA T, Coralina S. Caracterización química de harinas de frutos y hojas del árbol del pan (*Artocarpus Altilis*) y su empleo en la alimentación de pollos, conejos y ovinos de ceba. Tesis Doctoral Instituto de ciencia animal centro Universitario de guantánamo facultad agroforestal. 2010.
- [78]. MARTÍNEZ, T.F.; MCALLISTER, T.A.; ALARCÓN, F.J.; WANG, Y.; BARROSO, F.G.; REUTER, T., Fermentación ruminal *in vitro* de la harina de trigo tratada con taninos: 1. Efecto sobre la producción de ácidos grasos volátiles NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN SEOC, pp. 221-4. 2005.
- [79]. VALENCIAGA, Daiky; CHONGO, Bertha La pared celular. Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes Revista Cubana de Ciencia Agrícola Vol. 38, No. 4, pp. 343-50. 2004.
- [80]. SAVÓN, Lourdes; SCULL, Idania; ORTA, Mayelín; TORRES, Verena, Caracterización físico-química de la fracción fibrosa de cinco harinas de follajes tropicales para especies monogástricas Revista Cubana de Ciencia Agrícola Tomo 38, No. 3, 2004, pp. 291-5. 2003.
- [81]. CHACÍN, Jessonica; MARÍN, Merilyn; D'ADDOSIO, Rosa, Evaluación del contenido de pectina en diferentes genotipos de guayaba de la zona sur del Lago de Maracaibo MULTICIENCIAS Vol. 10, N° 1, pp. 7 - 12. 2010
- [82]. LECUMBERRI, Elena; MATEOS, Raquel; Izquierdo-Pulido, María; RUPÉREZ, Pilar; Goya, Luis; Bravo, Laura., Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.) Food Chemistry Vol. 104, pp. 948-54. 2007.
- [83]. VALENCIA, Francia E.; ROMAN M, María O., La fibra dietaria como alimento funcional VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín -Colombia. Vol 11, No 2, pp. 12-7. 2004.
- [84]. CASTILLEJO, Gemma; BULLÓ, Mónica; ANGUERA Anna; ESCRIBANO, Joaquin; Jordi SALAS-SALVADÓ. , A Controlled, Randomized, Double-Blind Trial to Evaluate the Effect of a Supplement of Cocoa Husk That Is Rich in Dietary Fiber on Colonic Transit in Constipated Pediatric Patients PEDIATRICS Vol. 118, No 3, pp. 641-9. 2006
- [85]. GONZÁLEZ E., Gabriel.; ROECKEL VONB., Marlene; SANHUEZA M., Verónica; VARGAS A., Daniela; ASPÉ L., Estrella. Medición de ácidos grasos volátiles mediante la degradación anaerobia de un vertido salino. Tesis de Pregrado. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería. Universidad de Concepción, Chile. 2006.
- [86]. SHUI, Guanghou; LEONG, Lai Peng., Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography Journal of Chromatography A Vol 977, pp. 89-96. 2002.

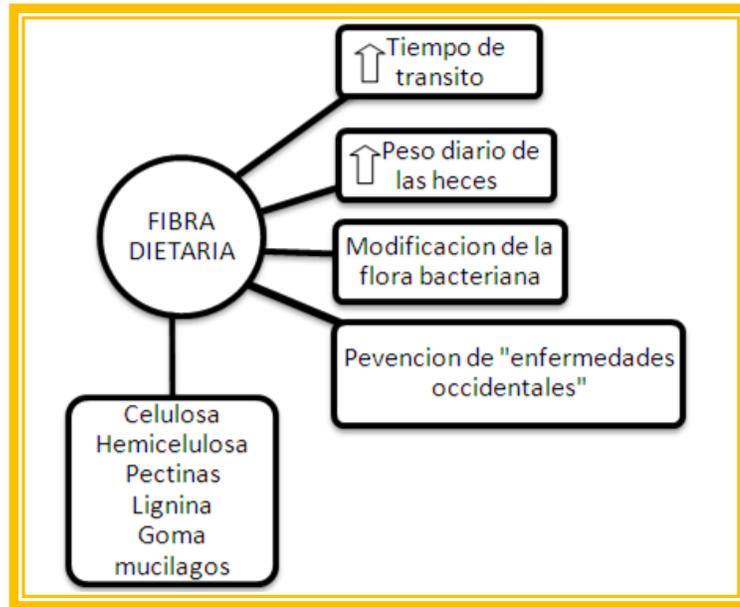
- [87]. CAWTHRAY, Gregory R., An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates *Journal of Chromatography A* Vol 1011, pp. 233-40. 2003.
- [88]. TORMO, M.; IZCO; J.M., Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products *Journal of Chromatography A*, Vol. 1033, pp. 305-10. 2004.
- [89]. ESTUPIÑAN I., Carlos Andrés. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DEL MUCÍLAGO DE *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller.), ENTRE DIFERENTES CULTIVOS DEL DEPARTAMENTO DE RISARALDA, COLOMBIA. POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE). Escuela de Química, Facultad de Tecnologías. Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira. 2012, pp. 112.
- [90]. CARRILLO, Leonor., Rumen y biogas *Microbiología agrícola*. 2003.
- [91]. FLÓREZ A, Oscar.; ROMÁN M, Orfilia.; MARTÍNEZ, Olga L.; GUTIÉRREZ E, Lucía; MEDINA, Gilma B. , Optimización de un preparado sólido de fibra Dietaria a partir de diferentes residuos de frutas VITAE, *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia*. Vol.13 No. 1, pp. 10-5. 2006.

ANEXOS

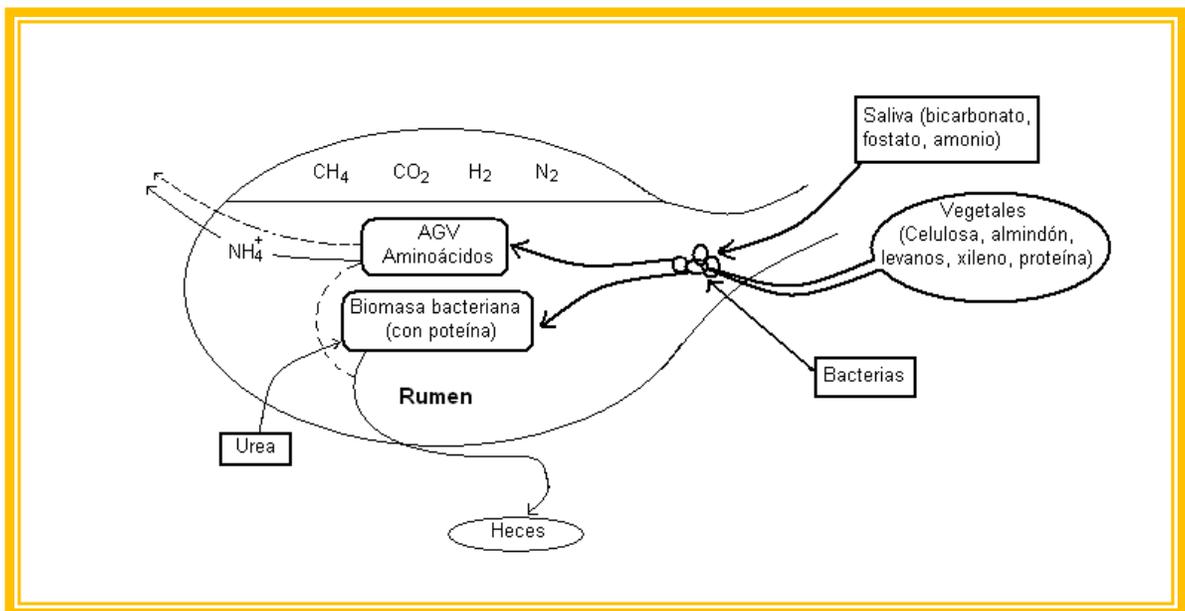
ANEXO 1. Estructura química de la lignina



ANEXO 2. Diagrama sobre la incidencia de la fibra dietaria en la salud



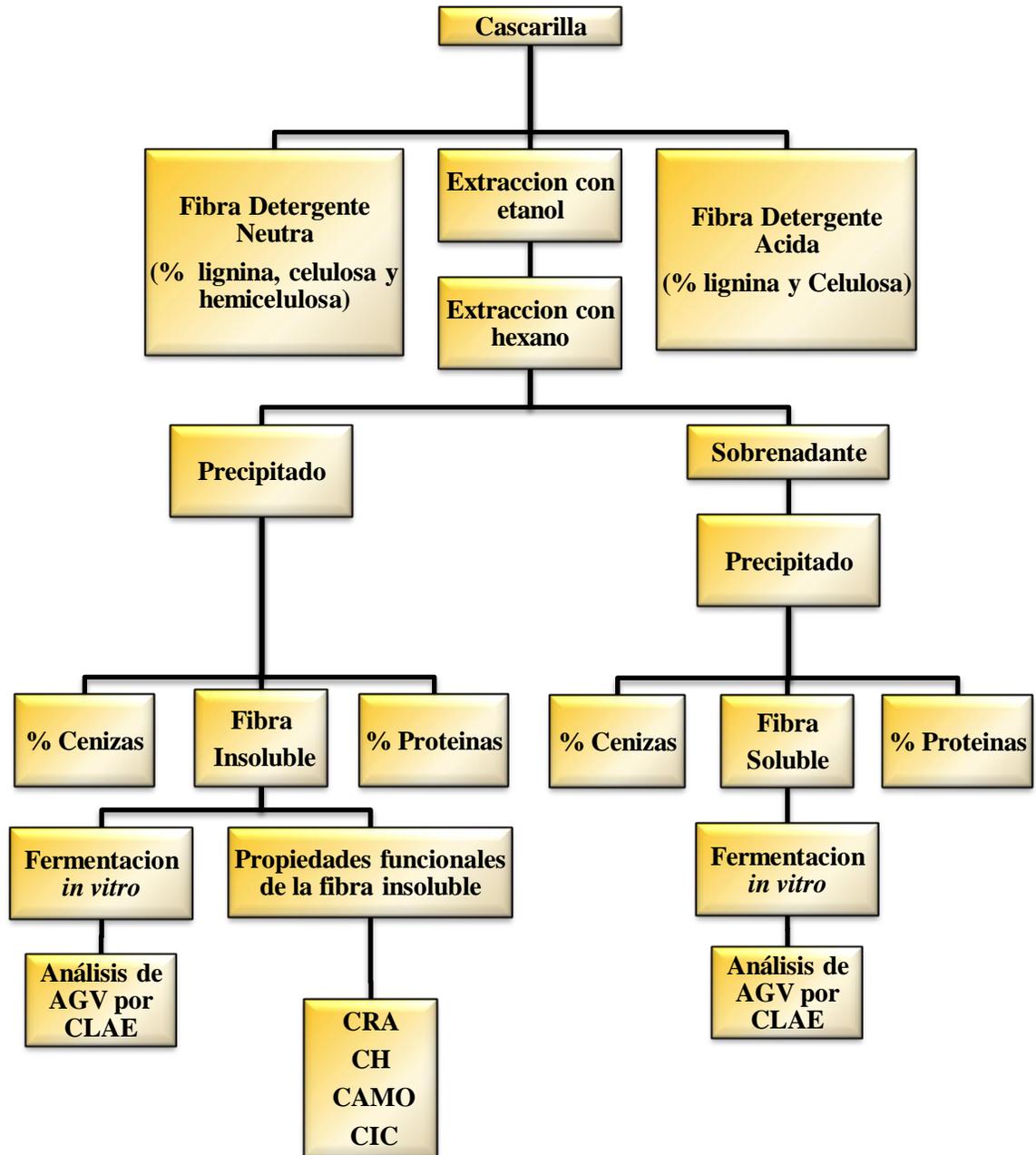
ANEXO 3. Diagrama de digestión anaerobia en el rumen[90]



ANEXO 4. Algunas Bacterias del Rumen[35]

| Organismo | Morfología | Movilidad | Productos de Fermentación | Sustrato |
|--|-----------------|-----------|--|---------------------|
| <i>Fibrobactersuccinogenes</i> | Bacilo | - | Succinato, acetato, formiato | Celulosa |
| <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> | Bacilo curvado | + | Acetato, formiato, lactato, butirato, H ₂ y CO ₂ | Celulosa |
| <i>Ruminococcus albus</i> | Coco | - | Acetato, formiato, H ₂ y CO ₂ | Celulosa |
| <i>Clostridium lochheadii</i> | Bacilo (espora) | + | Acetato, formiato, butirato, H ₂ y CO ₂ | Celulosa |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | Coco | | Acetato, succinato y H ₂ | Celulosa |
| <i>Clostridium polysaccharolyticum</i> | Bacilo (espora) | | Acetato, formiato, butirato y H ₂ | Celulosa Almidón |
| <i>Bacteroides rumenicola</i> | Bacilo | - | Formiato, acetato y succinate | Almidón |
| <i>Ruminobacter amylophilus</i> | Bacilo | - | Formiato, acetato y succinate | Almidón |
| <i>Selenomonas ruminantium</i> | Bacilo curvado | + | Acetato, propionato y lactato | Almidón |
| <i>Succinomas amylolytica</i> | Ovalado | + | Acetato, propionato y succinate | Almidón |
| <i>Streptococcus bovis</i> | Coco | - | Lactato | Almidón |
| <i>Selenomonas lactilytica</i> | Bacilo Curvado | + | Acetato y succinato | Lactato |
| <i>Magasphaera elsdenii</i> | Coco | - | Acetato, propionato, butirato, velerato, Copoato, H ₂ y CO ₂ | Lactato |
| <i>Viellonella párvula</i> | Coco | | Acetato, propionato y H ₂ | Lactato |
| <i>Lachnospira multiparus</i> | Bacilo curvado | + | Acetato, formiato, lactato, H ₂ y CO ₂ | Pectina |
| <i>Anaerovibrio lipolytica</i> | Bacilo | | Acetato, propionato y succinate | Lipolitico |
| <i>Eubacterium ruminantium</i> | Bacilo | | Formiato, butirato, lactosa y CO ₂ | Xilano |
| <i>Lactobacillus ruminis</i> | Bacilo | | Lactosa | Azucares |
| <i>Lactobacillus vitulinus</i> | Bacilo | | Lactosa | Azucares |
| <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> | Bacilo | - | CH ₄ | Matanógenos |
| <i>Methanomicrobium mobile</i> | Bacilo | + | CH ₄ | Matanógenos |
| <i>Eubacterium oxidoreducens</i> | Bacilo | | Lactosa y H ₂ | Aromaticos |

ANEXO 5. Diagrama de Flujo Metodología general



ANEXO 6. Determinación de proteínas y cenizas se obtuvieron

Ecuación 1: determinación de cenizas

$$m_{cenizas} = (m_{crisol+cenizas} - m_{crisol})$$

Ecuación 2: determinación de proteínas

$$N = \frac{V * N * 14}{1000}$$

$$m_{proteina} = N * F$$

Donde:

N: masa de nitrógeno

V: volumen del valorante

N: normalidad del valorante

F: factor de 6.25

ANEXO 7. Diferentes fuentes y contenidos de Fibra Total [54, 69, 74, 91]

| FUENTE | % FT | F/FS |
|--------------------|-------------|-------------|
| FORRAJES | | |
| Pergamino de Café | 24,4 | 32,2:1 |
| Trigo | 98,4 | 245:1 |
| FRUTAS | | |
| Manzana | 55,1 | 5,6:1 |
| Piña | 55,3 | 8:1 |
| LEGUMINOSAS | | |
| Guisante | 58,6 | 13,0:1 |
| Habas | 40,1 | 3,3:1 |

ANEXO 8. Ecuaciones para calcular propiedades funcionales de las fibras

Ecuación 3. Determinación de Capacidad de retención de agua

$$CRA = \frac{p1 - p2}{p2 - (0.028 * (p1 - p2))} * 100$$

Donde:

P1: masa del tubo con la muestra

P2: masa del tubo después de retirar el exceso de agua.

Ecuación 4. Determinación de capacidad de absorción de moléculas orgánicas

$$CRAc = \frac{p2 - p1}{p1}$$

Donde:

P1: peso de la muestra

P2: peso de la muestra con el aceite absorbido

Ecuación 5. Determinación capacidad de hinchamiento

$$CH = \frac{Vf - Vo}{P}$$

Donde:

Vf: volumen aumento por la fibra

Vo: volumen inicial ocupado por la fibra

P: peso de la muestra

ANEXO 9. Curva de calibración del ácido propiónico.

