

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

"Diseño del Proceso para la Elaboración de una Bebida  
Energética a partir de Excedentes de Cacao"

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

Tesis de Grado

Previo la obtención del Título de:

**INGENIERA DE ALIMENTOS**

Presentado por:

Fanny Carolina Cadena Fiallos

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2015

## AGRADECIMIENTO

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador.

A mis padres, hermanas, familiares, amigos, a Juan José por su apoyo.

Y al Ph.D Juan Manuel Cevallos, por su invaluable ayuda.

## DEDICATORIA

A DIOS

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

## TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

---

Ing. Jorge Duque R.

DECANO DE LA FIMCP

PRESIDENTE

---

Ph.D. Juan Manuel Cevallos C.

DIRECTOR DEL TFG

---

Ing. Priscila Castillo S.

VOCAL

## DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Trabajo Final de Graduación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

---

Fanny Carolina Cadena Fiallos

## RESUMEN

El presente trabajo detalla la obtención de una bebida energizante con cantidades importantes de teobromina, cafeína y flavonoides, minimizando el contenido de grasas; generando una alternativa para dar valor agregado a los excedentes de cacao como cáscara, placenta y pulpa.

La extracción de los compuestos fue desarrollada utilizando como solvente el agua en convección natural o forzada a 4 temperaturas (50°C, 60°C, 70°C y 80°C) durante 6 horas seguidas. Los resultados mostraron que las cantidades de cafeína y teobromina se maximizan mediante extracción a 60°C en la placenta y 70°C en la corteza, en un tiempo de 2 horas por convección forzada. Para la obtención de los flavonoides la temperatura óptima de extracción tanto para la placenta como para la corteza fue de 70°C en un tiempo de 2 horas por convección forzada.

Posteriormente, en el proceso de elaboración de la bebida se utilizaron procesos físicos, químicos y microbiológicos que involucraron trituración, lixiviación, filtración, pasteurización y clarificación.

Al producto final, se determinaron las características químicas, microbiológicas y sensoriales. La bebida de cacao presentó las siguientes características: 10,6 °Brix, 0,603 g ácido cítrico/ 100 cm<sup>3</sup> de muestra y pH de 3,9. Los resultados de las pruebas sensoriales (grado de satisfacción y preferencia) fueron positivos resaltando el sabor y el dulzor como aspectos buenos de la bebida. El contenido de polifenoles totales fue analizado mediante el método de Folin-Ciocalteu el cual fue de 0,53 mg de ácido gálico por litro y la cuantificación de cafeína y teobromina se realizó por medio de electroforesis capilar dando una concentración total de 21,81 mg/L aproximadamente. Consiguientemente, los excedentes de cacao se pueden utilizar como parte de las materias primas requeridas en la elaboración de bebidas energizantes.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN .....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS .....	vii
SIMBOLOGÍA .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	3
1.1. Generalidades del cacao .....	3
1.1.1. Tipos de cacao .....	6
1.1.2. Valor nutricional.....	7
1.2. Productos de cacao .....	9
1.2.1. Chocolate .....	9
1.2.2. Licor de cacao .....	10

1.2.3.	Otros productos .....	10
1.3.	Diseño de procesos para el uso de cacao .....	11
1.3.1.	Fermentación.....	11
1.3.2.	Tostado.....	12
1.3.3.	Prensado .....	12
1.3.4.	Otras operaciones y procesos unitarios.....	12
1.4.	Bebidas energizantes .....	14
1.4.1.	Componentes energizantes.....	15
1.4.2.	Proceso de elaboración .....	18
1.5.	Objetivos e Hipótesis .....	19

## CAPÍTULO 2

2.	METODOLOGÍA.....	21
2.1.	Muestreo y selección de mazorcas de cacao .....	21
2.2.	Diseño del proceso de deslipidización .....	22
2.3.	Diseño del proceso de obtención de teobromina y cafeína .....	24
2.4.	Diseño del proceso de obtención de flavonoides.....	27
2.5.	Obtención de bebida energizante .....	29
2.5.1.	Análisis químicos.....	32

2.5.2. Análisis sensoriales .....	34
2.6. Análisis estadístico .....	36

### CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS .....	38
3.1. Muestreo y selección .....	38
3.2. Proceso de deslipidización .....	39
3.3. Proceso de obtención de teobromina y cafeína .....	40
3.4. Proceso de obtención de flavonoides .....	49
3.5. Obtención de bebida energizante .....	53
3.5.1. Análisis químicos .....	59
3.5.2. Análisis sensoriales .....	60

### CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	70
---	----

### APÉNDICES

### BIBLIOGRAFÍA

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas
CM	Cuadrado medio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GAE	Equivalentes al ácido gálico
GL	Grados de libertad
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
ITS	Espaciadores Internos Transcritos
PDA	Potato dextrose agar
SC	Suma de cuadrados
TM	Toneladas métricas
TSA	Trypticase soy agar
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

## SIMBOLOGÍA

-	Menos
%	Tanto por ciento
+	Más
±	Más menos
°Brix	Grados Brix
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
B	Gramos de grasa
cm	Centímetros
e	Exponencial
g	Gramo
h	Hora
Has	Hectáreas
Kcal	Kilocalorías.
Kg	Kilogramos
kV	Kilovoltio
m	Metros

m <sup>2</sup>	Metros cuadrados
m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
mAu	Miliequivalencias de absorbancia
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
N	Normalidad
nm	Nanómetros
°	Grados
P	Gramos de la muestra
pH	Potencial de hidrógeno
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
t	Tiempo
V/V	Volumen sobre volumen
vs	Versus

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Partes del cacao	6
Figura 2.1. Sistema soxhlet	22
Figura 2.2. Equipo de electroforesis capilar	24
Figura 2.3. Espectrofotómetro	27
Figura 3.1. Mazorca de cacao	39
Figura 3.2. Extracción de grasa en placenta y corteza	39
Figura 3.3. Electroferograma de las sustancias patrón:	41
Figura 3.4. Espectro UV de (A) Teobromina y (B) Cafeína	42
Figura 3.5. Curva de calibración de cafeína y teobromina	43
Figura 3.6. Curva de calibración de cafeína y teobromina	43
Figura 3.7. Resultados experimentales y modelo teórico de las concentraciones de teobromina	45
Figura 3.8. Resultados experimentales y modelo teórico de las concentraciones de cafeína	46
Figura 3.9. Coeficientes de transferencia de masa en extracción de teobromina	47
Figura 3.10. Coeficientes de transferencia de masa en extracción de cafeína	48
Figura 3.11. Temperaturas óptimas de extracción de teobromina y cafeína	49
Figura 3.12. Curva de calibración del ácido gálico	50

Figura 3.13. Resultados experimentales y modelo teórico de las concentraciones de polifenoles	51
Figura 3.14. Coeficientes de transferencia de masa en extracción de polifenoles	52
Figura 3.15. Temperaturas óptimas de extracción de polifenoles	53
Figura 3.16. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida energética	54
Figura 3.17. Aplicación de enzimas en el extracto	56
Figura 3.18. Filtración de la bebida	57
Figura 3.19. Promedios de cada muestra	61
Figura 3.20. Resultados de prueba de preferencia	65

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tabla de superficie, producción y rendimiento del cacao	4
Tabla 2	Componentes químicos de las bebidas energizantes	16
Tabla 3	Diseño experimental para el análisis de teobromina y cafeína	26
Tabla 4	Diseño experimental para el análisis de flavonoides	29
Tabla 5	Análisis microbiológicos en producto final	35
Tabla 6	Tiempos y temperaturas de incubación	35
Tabla 7	Porcentajes de grasa en placenta y corteza	40
Tabla 8	Absorbancia de las muestras	56
Tabla 9	Identificación de microorganismos en el cacao	58
Tabla 10	Análisis microbiológicos de la bebida	58
Tabla 11	Características químicas de la bebida	59
Tabla 12	Escala hedónica de siete puntos	60
Tabla 13	Análisis de varianza para la apariencia	61
Tabla 14	Análisis de varianza para el color	62
Tabla 15	Análisis de varianza para el olor	63
Tabla 16	Análisis de varianza para el sabor	63
Tabla 17	Análisis de varianza para el dulzor	64

# INTRODUCCIÓN

En la extracción de la almendra fresca de cacao se generan grandes cantidades de residuos como cáscara, excedente de pulpa y placenta, los cuales poseen nutrientes y que en su mayoría no son aprovechados. En este proyecto se busca dar valor agregado a los residuos elaborando una bebida energética y de esta manera contribuir con el desarrollo de la industria de alimentos. El presente trabajo incluye los siguientes capítulos:

En el capítulo 1 se basa en el fundamento teórico referente al cacao, los tipos que existen, su composición, sus usos, los diferentes tratamientos que se utilizan para procesar el cacao. Además trata sobre las bebidas energizantes, como se definen, los componentes energéticos y su elaboración.

En el capítulo 2 se describe la metodología que se utilizará para realizar la extracción y cuantificación de la teobromina, cafeína y flavonoides. Asimismo, el proceso para la elaboración de la bebida, los análisis químicos y sensoriales que se efectuarán y como serán analizados dichos resultados.

En el capítulo 3 se detalla todos los resultados obtenidos una vez realizadas las pruebas por medio de la metodología ya descrita y el respectivo análisis estadístico.

Finalmente en el capítulo 4 se darán las pertinentes conclusiones y recomendaciones de las pruebas y análisis realizados.

# CAPÍTULO 1

## 1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 1.1. Generalidades del cacao

El cacao es uno de los principales productos que se cultiva en el Ecuador, su origen es tropical. Su nombre científico en griego es *Theobroma* que significa “comida de los dioses” (39).

En la tabla 1 se muestran las cifras de la producción del cacao en el país hasta el año 2011, las cuales registran a nivel nacional 224,163 TM, con una superficie sembrada de 521,091 Has. Y una superficie cosechada de 399,467 Has (39).

**TABLA 1**  
**TABLA DE SUPERFICIE, PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DEL CACAO**

<b>Año</b>	<b>Superficie sembrada (Has)</b>	<b>Superficie cosechada (Has)</b>	<b>Producción (TM)</b>	<b>Rendimiento</b>
2007	422,985	356,657	131,419	0.37
2008	455,414	360,025	132,100	0.37
2009	468,840	376,604	143,945	0.38
2010	470,054	398,104	189,755	0.48
2011	521,091	399,467	224,163	0.56

**Fuente:** Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca

**Elaborado por:** Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, PRO ECUADOR

La mazorca de cacao está constituida de 3 partes principales que son: la corteza, los granos y la placenta, de los cuales la corteza, el exceso de pulpa que envuelve al grano y la placenta no son aprovechadas en su totalidad.

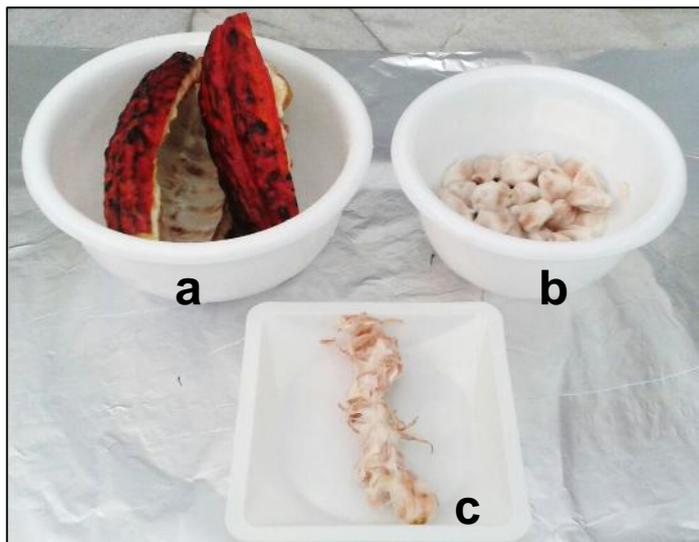
Las mazorcas de cacao tienen una corteza rugosa de aproximadamente 3 cm de espesor que en su interior contiene la pulpa y los granos de cacao. Representa aproximadamente el 64% del peso total de la mazorca (32).

La placenta es el eje central de la mazorca a la cual se encuentran unidos los granos de cacao, tiene adherida parte de la pulpa y una de

las principales funciones es la de proveer los nutrientes a los granos, por esta razón adquieren similares características. La placenta representa alrededor del 5% del peso total de la mazorca (3).

La pulpa que envuelve a las semillas del cacao está compuesta por células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales (8-10%). La pulpa contiene cerca del 1% de pectina. En la fermentación, la pulpa proporciona el sustrato para varios microorganismos que son fundamentales para el desarrollo de los precursores del sabor del chocolate (28).

La pulpa que hay en las mazorcas no es aprovechada en su totalidad por el proceso de fermentación, es por ello que el excedente es hidrolizado por microorganismos. La pulpa hidrolizada se conoce como exudado. Alrededor de 40 litros de pulpa se pueden conseguir de 800 kilos de semillas frescas. La pulpa es utilizada en la elaboración de helados, batidos, jugos, mermeladas, jaleas, entre otros productos. Además el exudado de la pulpa puede ser transformado en alcohol por medio de la fermentación (28).



a:Corteza, b:Granos con pulpa, c:Placenta

**Figura 1.1.** Partes del cacao

**Elaborado por:** Fanny Cadena

### 1.1.1. Tipos de cacao

A nivel mundial existen cuatro grupos de cacao: Criollo, Forastero, Trinitario y la variedad Nacional. En el Ecuador se puede encontrar el Nacional y el CCN51 que es un cacao clonado. La relación existente en la participación del Clon y el Cacao Nacional en las exportaciones ecuatorianas es de aproximadamente 75 % Cacao Nacional y 25 % CCN-51 (6).

El Cacao Nacional o también conocido como Cacao Fino de Aroma, tiene características importantes para la producción de chocolate

gourmet como sus fragancias y sabores frutales y florales. La mazorca es de color amarillo (40).

El agrónomo ambateño Homero Castro Zurita después de realizar una serie de investigaciones en 1965 obtiene el cacao CCN51 que significa Colección Castro Naranjal, lo considera un cacao corriente o común, con un alto rendimiento para la elaboración de productos a base de cacao. Su color característico es el rojo y es resistente a enfermedades (6).

### **1.1.2. Valor nutricional**

Los principales constituyentes del cacao son: agua, polifenoles (flavonoides), materia nitrogenada (proteínas y purinas que incluyen la teobromina y la cafeína), almidón y otros carbohidratos, manteca de cacao y la materia inorgánica (en especial el potasio y el fósforo) (30).

El cacao contiene cantidades pequeñas de cafeína, pero una cantidad alta de teobromina, una sustancia alcaloidea, similar a la cafeína, responsable de los efectos positivos del chocolate sobre el ánimo pues

se lo considera un estimulante suave ya que su eficacia como estimulante es 1/10 del efecto de la cafeína (13) (48).

Una porción de chocolate negro (40 g) contiene 2 a 11 mg de cafeína y 20 a 60 mg de teobromina, lo cual es una cantidad pequeña si se compara con el aporte de estas sustancias a partir de café (137 mg de cafeína y 60 mg de teobromina por porción de aproximadamente 10 g) (48).

Por otra parte muchas investigaciones realizadas indican que los antioxidantes encontrados en el cacao como los flavonoides, que son un tipo de polifenoles, tienen la capacidad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad en los vasos sanguíneos, es por ello, si se produce la oxidación se generaría una inflamación y por lo tanto, la activación como la agregación de las plaquetas en los vasos sanguíneos. Gracias a los flavonoides se evita una enfermedad cardiovascular conocida como arterioesclerosis (48). Los flavonoides por su alta hidrosolubilidad se pueden extraer fácilmente por lixiviación (10).

## **1.2.Productos de cacao**

### **1.2.1. Chocolate**

El chocolate es el producto final que se obtiene a través de un proceso apropiado de los granos de cacao. Se puede mezclar con diferentes ingredientes como edulcorantes, emulsionantes, aromas e incluso con productos lácteos, con excepción a los que imiten a los sabores naturales de chocolate y leche. Las fases de fabricación del chocolate son: tostado del grano a una temperatura alrededor de 130°C durante 20 minutos aproximadamente, molienda de los granos tostados para obtener una pasta líquida, esta pasta se mezcla con azúcar y con otros ingredientes como leche si se desea, se reduce el tamaño de las partículas de la mezcla a 25 micras por medio de una refinadora, luego se produce el conchado en donde se agita y se amasa la pasta con agitadores metálicos a una temperatura de 80°C para obtener una emulsión perfecta, enseguida se procede al templado para obtener una adecuada cristalización de la manteca de cacao reduciendo y aumentando la temperatura, después se vierte la masa en los moldes los cuales pasan por un túnel a baja temperatura y una vez que se endurecen los chocolates son envueltos en papel aluminio para luego ser comercializados (24) (37).

### **1.2.2. Licor de cacao**

El licor de cacao es una pasta fluida que se consigue a partir de que las almendras limpias y secas de cacao son tostadas a una temperatura alrededor de 130°C durante 20 minutos, luego se elimina la cascarilla y posteriormente los granos son molidos varias veces para producir una mezcla líquida pero espesa la cual es materia prima para la elaboración de chocolates y de algunas bebidas alcohólicas (6) (31).

### **1.2.3. Otros productos**

En los últimos años se han realizado estudios para elaborar nuevos productos utilizando como materia prima la pulpa y la placenta del cacao. Algunos de los productos son: galletas, bebidas alcohólicas, vinagre, néctares, entre otros (3) (50).

Las galletas son elaboradas con harina de placenta de cacao. Esta harina se obtiene mediante el secado de las placentas a una temperatura de 60°C por 7 horas y luego las placentas son molidas. Para elaborar las galletas, la harina de placenta de cacao se mezcla con harina de trigo, pasta de cacao, huevos, azúcar, polvo de hornear, margarina, leche, inmediatamente se amasa, se moldea y se hornea a una temperatura de 180°C por 30 minutos (3).

El vinagre se obtiene mediante dos procesos microbiológicos separados: primero una fermentación alcohólica de los azúcares naturales presentes en la pulpa de cacao, adicionando sacarosa para modificar el contenido de sólidos solubles para la acción y conversión de las levaduras del género *saccharomyces cerevisiae*; y en segundo lugar se produce la fermentación acética del alcohol adquirido, utilizando como inóculo el cultivo en el cual se desarrollaron las bacterias del género *acetobacter* responsables de la fermentación (50).

### **1.3. Diseño de procesos para el uso de cacao**

#### **1.3.1. Fermentación**

Es el proceso que radica en acumular los granos durante varios días con el objetivo de que los microorganismos descompongan e hidrolicen el mucílago (la pulpa blanca y azucarada que envuelve los granos), aumente la temperatura para producir la muerte del germen o embrión y se genere la producción de ácido acético interrumpiendo la estructura molecular interna, causando que los compuestos del cacao como proteínas, polifenoles, se mezclen y se generen las reacciones enzimáticas en el interior de los granos, que van a ser los responsables de la formación de los compuestos precursores del sabor a chocolate (14).

### **1.3.2. Tostado**

Los granos de cacao pasan por un proceso de tostado para facilitar la separación de la cascarilla conjuntamente para que los precursores del sabor (azúcares, aminoácidos y otros que se forman durante la fermentación) se combinen y conviertan, generando así los olores y el sabor característico a chocolate y otros sabores como floral, frutal y nuez, según el tipo de cacao. Por lo general las habas son tostadas desde 110 hasta 150° C durante 25 a 50 minutos (38).

### **1.3.3. Prensado**

Es la operación en la cual se separa el líquido de un sistema de dos fases de sólido-líquido mediante la compresión, permitiendo que el líquido escape al mismo tiempo que se retiene el sólido entre las superficies de compresión. Es muy utilizado para extraer la manteca de cacao.

### **1.3.4. Otras operaciones y procesos unitarios**

La lixiviación es una operación de transferencia de masa que consiste en separar y extraer un soluto deseable o eliminar un soluto indeseable de la fase sólida poniéndolos en contacto con una fase líquida. Es

indispensable que exista un contacto íntimo entre el solvente y el soluto contenido en el sólido (20).

En la lixiviación de materiales solubles del interior de una partícula por acción de un disolvente, el proceso general consiste en los siguientes pasos: el disolvente se transfiere del volumen de solución a la superficie del sólido. Posteriormente, dicho disolvente penetra o se difunde en el sólido. El soluto se disuelve en el disolvente. Entonces, el soluto se difunde a través de la mezcla de sólido y disolvente hasta la superficie de la partícula. Finalmente, el soluto se transfiere a la solución general (20).

Cuando un material se disuelve de un sólido a la solución de disolvente, la velocidad de transferencia de masa desde la superficie sólida al líquido, suele ser el factor que controla la totalidad del proceso. En esencia no hay resistencia en la fase sólida cuando se trata de materia pura (20).

La velocidad de transferencia de masa de un soluto  $A$  que se está disolviendo en la solución de volumen  $V$  en  $\text{m}^3$  es

$$\frac{\bar{N}_A}{A} = k_L(C_{AS} - C_A) \quad (1.3.4-1)$$

Donde  $\bar{N}_A$  son los kmol de A que se disuelven en la solución/ en 1 s, A es el área superficial de las partículas en m<sup>2</sup>,  $k_L$  es el coeficiente de transferencia de masa en m/s,  $C_{AS}$  es la solubilidad de saturación del soluto A en la solución en kg/ m<sup>3</sup>, y  $C_A$  la concentración de A en la solución en el tiempo t s, en kg/ m<sup>3</sup>.

$$\frac{vdc}{dt} = \bar{N}_A = Ak_L(C_{AS} - C_A) \quad (1.3.4-2)$$

Integrando desde  $t=0$  y  $C_A = C_{A0}$  hasta  $t=t'$  y  $C_A = C_{A'}$

$$\int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dC_A}{(C_{AS}-C_A)} = \frac{Ak_L}{V} \int_{t=0}^t dt \quad (1.3.4-3)$$

$$\frac{C_{AS}-C_A}{C_{AS}-C_{A0}} = e^{-\left(\frac{k_L A}{V}\right)t} \quad (1.3.4-4)$$

La solución tiende de manera exponencial a condiciones de saturación.

#### 1.4. Bebidas energizantes

“Las bebidas energizantes son bebidas no alcohólicas, carbonatadas o no, desarrolladas para mejorar momentáneamente el rendimiento humano” (22).

Las bebidas energizantes son consumidas principalmente por adolescentes y adultos jóvenes. El consumo de bebidas energéticas ha experimentado una notable expansión en los últimos años y los motivos para su consumo usualmente son: para estudiar, para obtener energía, para mantenerse despierto en las noches, para maximizar el rendimiento y anular la fatiga en las competencias deportivas (42).

En 2011, la consultora estadounidense Mintel consideró que las bebidas energéticas mueven más de 8.000 millones de dólares anuales, lo que significó un incremento del 16% con respecto al año anterior. Mintel proyectó que este mercado crecería un 92% en el lapso de tiempo comprendido entre los años 2011-2016 debido a la innovación en este tipo de productos y lo relativamente joven de esta industria (19).

#### **1.4.1. Componentes energizantes**

Las bebidas energéticas están compuestas esencialmente por cafeína, hidratos de carbono, vitaminas, minerales, aminoácidos, extractos vegetales además de aditivos como acidulantes, conservantes, saborizantes y colorantes. Sin embargo, son la cafeína y el azúcar que proporcionan el efecto energético en las bebidas (12).

En la tabla 2 se muestran los componentes principales de algunas bebidas energizantes que actualmente se comercializan y sus respectivas proporciones.

**TABLA 2**  
**COMPONENTES QUÍMICOS DE LAS BEBIDAS ENERGIZANTES**

<b>Características</b>	<b>DYNAMIC</b>	<b>RHINO'S</b>	<b>RED BULL</b>	<b>SHOT</b>	<b>CICLON</b>
Volumen	296 mL	250 mL	250 mL	250 mL	250 mL
Calorías	53 Kc	114.5 Kc	112.5 Kc	128.5 Kc	122.5 Kc
Carbohidratos	15 g	30 g	28 g	29.5 g	Si *
Cafeína	29 mg	0.03%	80 mg	80 mg	Si *
Taurina	250 mg	0.38%	1000 mg	1000 mg	1000 mg
Proteínas	0 g	0.4 g	0 g	0.75 g	No
Vitaminas	B <sub>6</sub> , C	B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub>	B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub>	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub>	B <sub>6</sub> , B <sub>2</sub> , C
Guaraná	Si *	No	No	0.1%	No
Inositol	Si *	0.02%	Si *	No	Si *
Biotina	Si *	No	No	No	0.075 mg
Niacina	Si *	20 mg	20 mg	6.75 mg	Si *
Glucuronolactona	No	0.23%	600 mg	No	No

\*:No se especifica cantidad en la lata.

**Fuente:** Cote Menéndez M, Rangel Garzón C, Sánchez Torres M, Medina-Lemus A. 2011 (13).

A continuación se describen los principales componentes de las bebidas energizantes:

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) y la teofilina (1,3-dimetilxantina) pertenecen a este grupo y tienen como objetivo producir un efecto estimulante y reducir la fatiga. Debido a una reacción de metilación, la cafeína se convierte en paraxantina (1,7-dimetilxantina) 84%, teobromina (3,7- dimetilxantina) 12% y teofilina (1,3- dimetilxantina) 4% (13).

Muchas de las bebidas energizantes que se comercializan contienen carbohidratos tales como: glucuronolactona, glucosa, fructosa, sacarosa, maltodextrinas o galactosa (13).

El más frecuente aminoácido es la taurina. Su nombre químico es ácido 2-aminoetanosulfónico. Es diferente de los otros aminos ácidos, ya que contiene un grupo ácido sulfónico, en lugar de un grupo ácido carboxílico. Además contiene aminoácidos individuales como la glutamina, la arginina y aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) (34).

Dentro de las vitaminas se encuentran: B1 (Tiamina), B2 (riboflavina), B6 (piridoxina), B12 (cobalamina), C (antioxidante, mejora la liberación

de energía). En ciertas bebidas se incluyen algunos minerales, como magnesio y potasio, aunque en cantidades reducidas (42).

Entre los extracto de hierbas: guaraná, yerba mate, ginseng (Panax quinquefolium y Panax ginseng) (34).

En lo que se refiere a aditivos acidulantes, se utiliza ácido cítrico y citratos de sodio, para dar mejor sensación de sabor. El conservante más común es el benzoato de sodio, y el color es levemente amarillo verdoso, tonalidad alcanzada con riboflavina o extracto de cártamo. No contienen materias grasas (34).

#### **1.4.2. Proceso de elaboración**

El proceso de elaboración de una bebida en general se puede dividir en tres etapas:

##### **Preparación para la extracción**

En esta etapa son esenciales las operaciones preliminares como lo son el lavado y selección. Consecutivamente la materia prima es enviada a equipos de cortado o molienda que permiten la reducción del tamaño de la fruta para facilitar la extracción (35).

### **Extracción de la bebida**

Existen varios métodos de extracción de jugo tales como: prensado, centrifugación o la difusión de agua caliente para extraer los sólidos de la fruta previamente cortada en partículas pequeñas (35).

### **Operaciones post- extracción**

Entre este grupo de operaciones se encuentran: la clarificación enzimática, filtración, centrifugación, homogeneización, desaireación, concentración, recuperación de aromas, pasteurización, almacenamiento y envasado. La aplicación de cada una de estas operaciones dependerá de la clase de bebida que se desee conseguir (35).

## **1.5. Objetivos e Hipótesis**

### **Objetivos**

#### **Objetivo principal**

Desarrollar un proceso para la obtención de una bebida energizante a base de los excedentes de la mazorca de cacao que contenga antioxidantes, teobromina y cafeína, minimizando las grasas.

### **Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de este proyecto son:

- Determinar las condiciones apropiadas para la extracción de los compuestos teobromina, cafeína, flavonoides y grasa.
- Establecer los procesos de clarificación y pasteurización del producto.
- Determinar las características químicas, microbiológicas y sensoriales del producto final.

### **Hipótesis**

La hipótesis de este proyecto se basa en que la placenta, corteza y excedente de pulpa de cacao puedan ser utilizadas para la elaboración de una bebida energizante aportando con nutrientes como teobromina, cafeína y flavonoides.

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Muestreo y selección de mazorcas de cacao

Las mazorcas de cacao que se utilizaron en la elaboración de la bebida son del tipo CCN-51 y fueron obtenidas de haciendas cacaoteras en el cantón Montalvo, provincia de Los Ríos. Las mazorcas fueron seleccionadas en el momento de la cosecha, considerando su madurez por medio de su color rojo característico y su apariencia, es decir que no presenten rasgos de alguna enfermedad o plaga.

Una vez seleccionadas las mazorcas fueron trasladadas a los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador donde fueron lavadas y desinfectadas para posteriormente cortarlas y separarlas por corteza, placenta y granos con pulpa. La corteza y

placenta se utilizaron para realizar los análisis y de los granos se extrajo la pulpa hidrolizada o exudado.

## 2.2. Diseño del proceso de deslipidización

En este proyecto, la deslipidización consistió en el diseño y evaluación de procesos que minimicen la cantidad de grasa del producto final. Para determinar el proceso adecuado de reducción de grasas primero se determinó la cantidad inicial de grasa que tienen las muestras de cacao, para lo que se siguió el procedimiento descrito en el manual de Técnicas de análisis químico de alimentos de la Doctora Margot Vélez que consiste en utilizar el método Soxhlet (49).



**Figura 2.1.** Sistema Soxhlet  
**Elaborada por:** Fanny Cadena

Se pesaron 5g de cada una de las muestras secas y molidas, se colocaron en papel filtro y posteriormente en los dedales de celulosa. Se utilizó hexano como disolvente. El tiempo de extracción fue durante 4 horas. Se recuperó el disolvente mediante rotavaporación y el residuo se secó en la estufa a 105°C durante 1 hora. Se pesó el residuo es decir la grasa y se efectúa el siguiente cálculo:

$$\%grasa = \frac{B * 100}{P}$$

*B*=gramos de grasa

*P*=gramos de muestra

Luego de esto se procedió a evaluar sistemas acuosos de reducción de grasas como sigue: La reducción de grasas se realizó de forma separada de la placenta con la corteza utilizando agua como solvente con una concentración de 60 g de materia prima en 100 ml de agua.

La extracción de los compuestos fue desarrollada en convección natural y convección forzada a 4 diferentes temperaturas y a 6 diferentes horas. La cantidad de grasa residual en cada evaluación fue determinada y el proceso que minimizó la cantidad de grasa fue seleccionado. Se utilizó la ecuación (1.3.4-4) para estimar la transferencia de grasa en el proceso de extracción.

### 2.3. Diseño del proceso de obtención de teobromina y cafeína

Varios procesos de extracción de teobromina y cafeína fueron evaluados para determinar las condiciones que maximicen la presencia de estos compuestos en la bebida energética final. La concentración de teobromina y cafeína se determinó mediante electroforesis capilar, la cual es una técnica que separa los diferentes compuestos dentro de una misma solución y los cuantifica (12).

El equipo de electroforesis capilar utilizado es de la marca AGILENT 7100 como se muestra en la figura 2.2, equipado con una columna capilar de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 35 cm de largo y fuente de poder con polaridad positiva. Para el análisis y la identificación se utilizó el software del equipo electroforesis capilar (Agilent CE7100, Data Analysis).



**Figura 2.2.** Equipo de electroforesis capilar

**Elaborada por:** Fanny Cadena

**Preparación de la curva de calibración:**

Para realizar las curvas de calibración se realizaron varias diluciones del estándar de Teobromina y Cafeína con agua destilada, las cuales fueron leídas en el equipo de electroforesis capilar. Las concentraciones de las diferentes diluciones fueron entre 0,25 mg/ml y 0,0025 mg/ml. Luego de esto la curva de calibración fue construida mediante la gráfica de concentración vs absorbancia.

**Preparación de las muestras:**

La extracción de teobromina y cafeína se realizó de forma separada en la placenta y la corteza. La pulpa fue aprovechada completamente. El solvente utilizado fue el agua, con una concentración de 60 g de materia prima en 100 ml de agua. La extracción de los compuestos fue desarrollada en convección natural y convección forzada a 4 diferentes temperaturas y a 6 diferentes horas (tabla 3). Para realizar la transferencia de calor por convección forzada se utilizó un agitador a 200 rpm y en convección natural no se utilizó el agitador (15).

Una vez que se obtiene los extractos cada uno fue centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4°C y filtrado a través de filtros de jeringa de 0,2 µm para poder ser analizados en el equipo de electroforesis.

**TABLA 3**  
**DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ANÁLISIS DE TEOBROMINA Y CAFEÍNA**

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>	<b>Variable de respuesta</b>
Temperatura	50°C 60°C 70°C 80°C	Teobromina (µg/ml)  Cafeína (µg/ml)
Tiempo	1h 2h 3h 4h 5h 6h	
Modo de transferencia de calor	Convección forzada (200rpm) Convección natural	

**Elaborado por:** Fanny Cadena

**Condiciones analíticas:**

En el análisis de las muestras se utilizó un buffer que contiene 100mM dodecil sulfato de sodio (SDS), 25 mM fosfato y 6%(v/v) de metanol, pH 7.0. Además se efectuó a 20°C, 20 kV durante 12 min. La detección se realizó entre 210 nm y 350 nm (15).

Se utilizó la ecuación (1.3.4-4) para estimar la transferencia de teobromina y cafeína en el proceso de extracción a las diferentes condiciones.

## 2.4. Diseño del proceso de obtención de flavonoides

La concentración de flavonoides se estimó utilizando la metodología de análisis de polifenoles totales, que consiste en una reacción colorimétrica de óxido reducción medida por espectrofotometría (21).



**Figura 2.3.** Espectrofotómetro  
**Elaborada por:** Fanny Cadena

### **Preparación de la curva de calibración:**

Para realizar la curva de calibración se utilizó diluciones a diferentes concentraciones de ácido gálico con agua destilada. Las concentraciones fueron entre 4  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/ml y 56  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/ml. En varios recipientes ámbar se colocaron 500  $\mu\text{l}$  de cada una de las diluciones y se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  del reactivo Folin-Ciocalteu y luego se añadieron 1250  $\mu\text{l}$  de Carbonato de sodio al 20%.

Se agita y se deja reposar durante 2 horas. Para efectuar la medición se colocaron 200  $\mu$ l de las diluciones de los tubos ámbar y se ubicaron en una microplaca, las cuales se midieron en un espectrofotómetro a 760 nm (21).

#### **Preparación de las muestras:**

La extracción se realizó de forma separada de la placenta con la corteza. El solvente utilizado fue el agua dada la alta hidrosolubilidad, con una concentración de 60g de materia prima en 100 ml de agua. La extracción de los compuestos fue desarrollada acorde al diseño experimental en la tabla 4. Para realizar la transferencia de calor por convección forzada se utilizó un agitador a 200 rpm y en convección natural no se utilizó el agitador (10) (15).

Las muestras para ser analizadas en el espectrofotómetro debe seguir el mismo protocolo que se efectúa para las diluciones de ácido gálico en la elaboración de la curva de calibración.

**TABLA 4**  
**DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ANÁLISIS DE FLAVONOIDES**

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>	<b>Variable de respuesta</b>
Temperatura	50°C 60°C 70°C 80°C	Flavonoides (µg/ml)
Tiempo	1h 2h 3h 4h 5h 6h	
Modo de transferencia de calor	Convección forzada (200 rpm) Convección natural	

**Elaborado por:** Fanny Cadena

Al igual que en la extracción de teobromina y cafeína, para estimar la transferencia de flavonoides en el proceso de extracción a las diferentes condiciones se utilizó la ecuación (1.3.4-4).

### **2.5. Obtención de bebida energizante**

El proceso de elaboración de la bebida se realizó a nivel de laboratorio y las etapas se detallan a continuación:

### **Recepción de materia prima**

Las mazorcas una vez seleccionadas por su madurez y su apariencia en el momento de la cosecha, fueron llevadas al laboratorio para realizar los análisis químicos y microbiológicos.

### **Lavado y desinfección**

Las mazorcas fueron desinfectadas con agua clorada a una concentración de 100 ppm, luego enjuagadas con agua potable (33).

### **Pesado**

La mazorca fue separada en tres partes, la corteza, la placenta y los granos con pulpa. Luego se pesaron la corteza y la placenta, los granos se los colocó en un recipiente en donde comienza el proceso de fermentación y del cual se extrae la pulpa hidrolizada.

### **Trituración**

Esta etapa tiene como objetivo reducir el tamaño de la mazorca para aumentar el área de superficie de contacto con el solvente al momento de la extracción y que el proceso sea más efectivo. La trituración de la

corteza y la placenta se realizó de forma manual con un cuchillo de acero inoxidable (44).

### **Extracción**

La extracción por lixiviación se llevó a cabo utilizando como solvente al agua, y a la temperatura y tiempos óptimos del proceso. Se añadió ácido cítrico para mejorar la extracción de los compuestos de cafeína, teobromina (43).

### **Centrifugación**

Una vez que se obtiene el extracto, fue centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4°C.

### **Clarificación**

Para la clarificación del jugo, se utilizó enzimas comerciales como pectinasas al 0.1% a un pH de 4 y una temperatura de 30°C aproximadamente durante 6 horas, que ayudan a mejorar la apariencia y viscosidad de la bebida y cuya acción causa la hidrólisis y desestabilización de los coloides (10) (36).

## **Homogeneización**

Se agregó sacarosa, la pulpa hidrolizada a la bebida y se mezclan.

## **Pasteurización**

Este proceso tiene dos objetivos principales, el primero es la inactivación enzimática y el segundo la destrucción de gérmenes causantes de alteraciones. La bebida fue calentada hasta alcanzar una temperatura de pasteurización de 80 °C por dos minutos (10) (51).

### **2.5.1. Análisis químicos**

#### **Acidez titulable**

Para el desarrollo de éste análisis se colocaron 50 ml de la bebida en un vaso de precipitación. Se llenó una bureta con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N y se tomó la lectura de la cantidad de solución en la bureta ubicada en un soporte universal. En el vaso de precipitación que contiene la muestra, se le agregaron 5 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador. Se añadió gota por gota la solución de hidróxido de sodio, simultáneamente se gira lentamente el vaso de precipitación con la muestra. Una vez que aparece el color rosado fue cerrada la llave de la bureta y se continúa girando el vaso para ver si el color perdura, si

no cambia de color a rosado se adiciona cada vez una gota más de hidróxido de sodio. Si el color permanece, se da por terminada la titulación. Se tomó la lectura en la bureta, se calculó la cantidad de hidróxido de sodio usada para neutralizar la acidez de la muestra y se realizó el siguiente cálculo.

$$Acidez = \frac{V_1 N}{V}$$

A = acidez tituable en miliequivalentes por centímetro cúbico,

V<sub>1</sub> = volumen de la solución 0,1 N de hidróxido de sodio utilizada en la titulación, en cm<sup>3</sup>,

N = normalidad de la solución de hidróxido de sodio,

V = volumen de la muestra utilizada en el ensayo, en cm<sup>3</sup>.

Para expresar la acidez en g de ácido cítrico/cm<sup>3</sup> de muestra, se utilizó el factor de conversión de miliequivalentes a gramos de ácido cítrico que es de 0,064 (23).

### **Grados Brix**

Para determinar la cantidad de sólidos solubles en la bebida, se determinaron los grados °Brix, utilizando el refractómetro. Es un análisis

sencillo, en el cual primero se calibra el refractómetro con agua destilada, luego se coloca la muestra y se procede a tomar la lectura (25).

## **pH**

Se midió el grado de acidez de la bebida por medio de un potenciómetro. Primero se calibró el instrumento con los buffers, y luego se colocó la muestra líquida en un vaso de precipitación para ser analizada por el equipo.

### **2.5.2. Análisis sensoriales**

Primero se efectuaron los análisis microbiológicos para descartar la presencia de patógenos en las materias primas y para validar el tratamiento térmico en el producto final. En la materia prima se realizó un conteo e identificación de microorganismos totales. Para esto 1 g de muestra fue suspendido en 9 mL de agua de peptona y agitado vigorosamente. El agua de peptona fue luego sembrada en medios PDA y TSA e incubados de 3 a 5 días a 35 °C en condiciones aerobias y anaerobias por separado. Los microorganismos obtenidos fueron identificados por medio de secuenciación de las regiones 16s e ITS del ADN de las bacterias y levaduras respectivamente (9). La selección de

los tiempos y temperaturas de pasteurización de la bebida se realizó en base a los microorganismos identificados. La validación del proceso de pasteurización se realizó mediante los análisis detallados en la Tabla 5.

**TABLA 5**  
**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN PRODUCTO FINAL**

<b>Prueba</b>	<b>Método de ensayo</b>	<b>Marca</b>
Aerobios totales	AOAC método oficial 990.12	RIDA®COUNT Petrifilm
E. coli	AOAC método oficial 991.13	3M Petrifilm
Coliformes	AOAC método oficial 991.14	3M Petrifilm
Salmonella	ISO 6579:2002	RIDA®COUNT Petrifilm
Mohos y Levaduras	AOAC Método oficial 997.02	3M Petrifilm

**Elaborado por:** Fanny Cadena

**TABLA 6**  
**TIEMPOS Y TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN**

<b>Prueba</b>	<b>tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Aerobios totales	48 ± 3 h	35 ± 1 °C
E. coli	48 ± 2 h	35 ± 1 °C
Coliformes	24 ± 2h	35 ± 1 °C
Salmonella	24 ± 2 h	37 ± 1 °C
Mohos y Levaduras	3 a 5 días	20-25 °C

**Fuente:** Guía práctica para la interpretación y lectura de las Placas Petrifilm de 3M (1).

Una vez obtenida la bebida y hechos los análisis microbiológicos, se evaluó la bebida a través de pruebas sensoriales con dos diferentes grados de dulzor para determinar las preferencias del consumidor.

Se realizó una prueba de medición del grado de satisfacción, para determinar cuánto les gusta o disgusta algunas características de la bebida como apariencia, color, olor sabor y dulzor. Se utilizaron escalas hedónicas verbales de siete puntos para tener resultados más precisos (7).

Además se realizó una prueba de preferencia para conocer si los jueces prefieren una muestra con mayor grado de dulzor que otra con menor grado de dulzor. Esta prueba es sencilla y consiste en preguntarle al juez cuál de las dos muestras prefiere (7).

## **2.6. Análisis estadístico**

Para determinar las condiciones óptimas en las cuales se obtenga la mayor concentración de cafeína, teobromina y flavonoides del cacao, se utilizó regresión no lineal por medio de la herramienta XLSTAT en Excel utilizando como variable independiente al tiempo de extracción,

variable dependiente a la concentración del compuesto en el solvente y constantes al área superficial de las partículas y volumen en que se está disolviendo el compuesto. Se estimó los valores de coeficiente de masa y las concentraciones de saturación del soluto en la solución.

Los datos de las pruebas de grado de satisfacción se analizaron estadísticamente mediante ensayo de ANOVA con un nivel de significancia del 5% para poder comparar las muestras utilizando la tabla de distribución F (Apéndice A). Y para la prueba de preferencia se utilizó la tabla de significancia para pruebas de dos muestras (Apéndice B).

# **CAPÍTULO 3**

## **3. RESULTADOS**

En este capítulo se detallan por medio de tablas y figuras los resultados que se obtuvieron para la identificación y cuantificación de teobromina, cafeína y polifenoles, además de la obtención de la bebida y los respectivos análisis realizados.

### **3.1. Muestreo y selección**

Las mazorcas que fueron seleccionadas presentaron una coloración rojiza y un buen estado como se observa en la figura 3.1, sin señales de daños ni plagas. Luego se cortaron y separaron por corteza, placenta y granos de los cuales se obtuvo la pulpa hidrolizada.



**Figura 3.1.** Mazorca de cacao  
**Elaborada por:** Fanny Cadena

### **3.2. Proceso de deslipidización**

En la figura 3.2 se muestran los extractos de grasa que se consiguieron de la deslipidización, posteriormente se hicieron los cálculos para determinar el porcentaje de grasa los cuales se describen en la tabla 7. Además estos análisis fueron realizados por un laboratorio externo para corroborar los resultados.



**Figura 3.2.** Extracción de grasa en placenta y corteza  
**Elaborado por:** Fanny Cadena

**TABLA 7**  
**PORCENTAJES DE GRASA EN PLACENTA Y CORTEZA**

<b>Muestra</b>	<b>Laboratorio</b>	<b>PROTAL*</b>
Placenta	0,50%	0,65%
Corteza	0,08%	0,10%

\*Ver Apéndice C y D

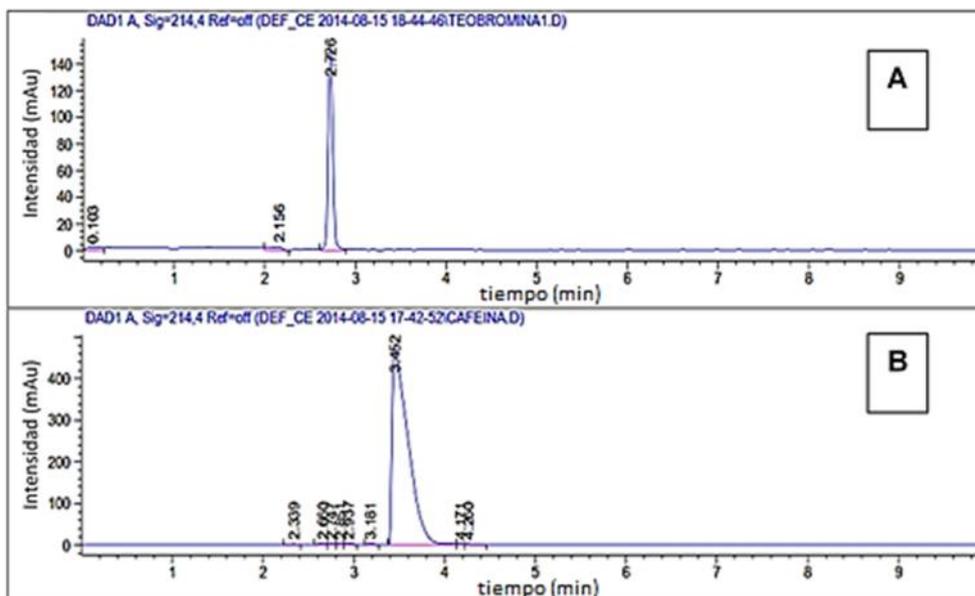
**Elaborado por:** Fanny Cadena

Los porcentajes de grasa en la placenta y corteza son valores muy bajos, menores o aproximados al 0,5% de su composición y basándose en la norma INEN 1334-2 que se refiere al rotulado de productos alimenticios para consumo humano, se pueden expresar como “cero” ya que la norma indica que los porcentajes menores al 0,5% deben reportarse de esta manera. Lo cual no fue un inconveniente en la elaboración de la bebida, porque se requirió que esta no contenga grasa (27).

### **3.3. Proceso de obtención de teobromina y cafeína**

En la figura 3.3 se presentan los electroferogramas de los estándares de cafeína y teobromina que fueron disueltos en agua, y conjuntamente se agregó ácido cítrico para obtener un pH ácido por lo que las dos sustancias tienen mayor solubilidad en medios ácidos.

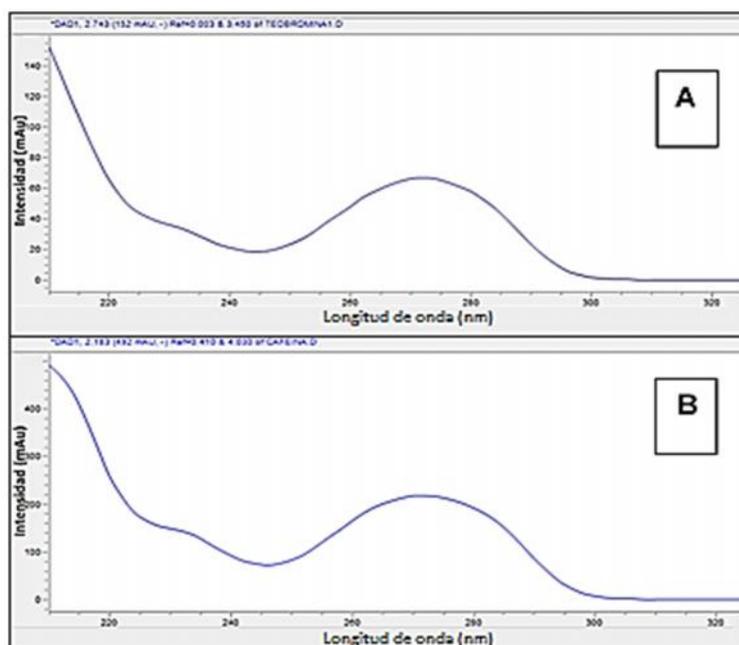
Al momento de realizar las mediciones se establece una longitud de onda entre 200-350 nm debido a que los espectros ultravioleta de los dos compuestos se encuentra entre estos valores (16) (43) (46).



**Figura 3.3.** Electroferograma de las sustancias patrón:  
(A) Teobromina, (B) Cafeína

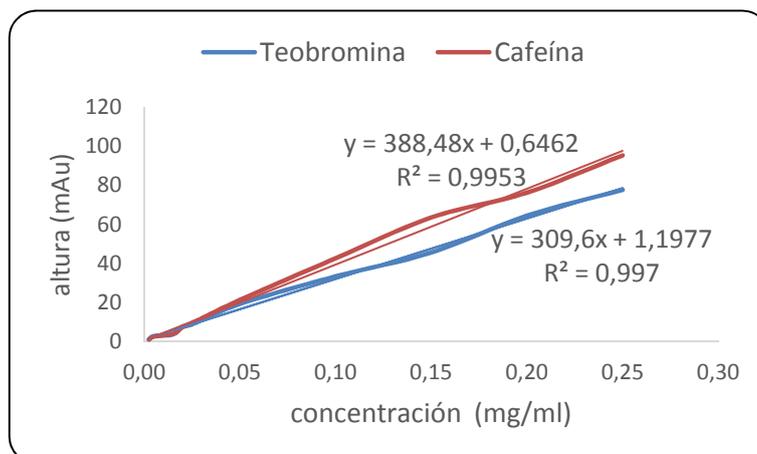
**Elaborado por:** Agilent CE7100, Data Analysis

El tiempo de retención, es decir el tiempo en que es detectada la sustancia en el equipo de electroforesis, para la teobromina fue de aproximadamente 2,726 minutos y el de la cafeína 3,452 minutos. Este tiempo fue esencial para la identificación de cada compuesto al momento de analizar los extractos, porque los espectros UV de ambos fueron similares como se observa en la figura 3.4.



**Figura 3.4.** Espectro UV de (A) Teobromina y (B) Cafeína  
**Elaborado por:** Agilent CE7100, Data Analysis

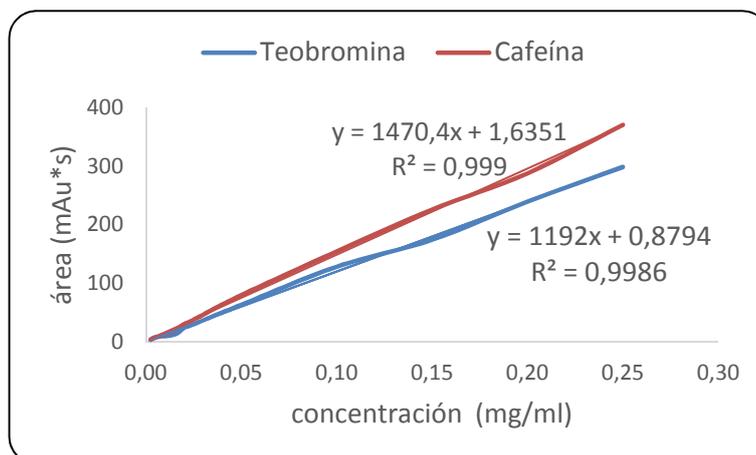
En la Figura 3.5 se puede observar la curva de calibración de la teobromina y cafeína, esta se efectuó con los datos de concentración y altura del pico de cada estándar a distintas diluciones.



**Figura 3.5.** Curva de calibración de cafeína y teobromina

**Elaborado por:** Fanny Cadena

En la Figura 3.6 se expresa la curva de calibración de la teobromina y cafeína que se generó con los datos de concentración y el área bajo el pico de cada sustancia patrón a distintas diluciones.

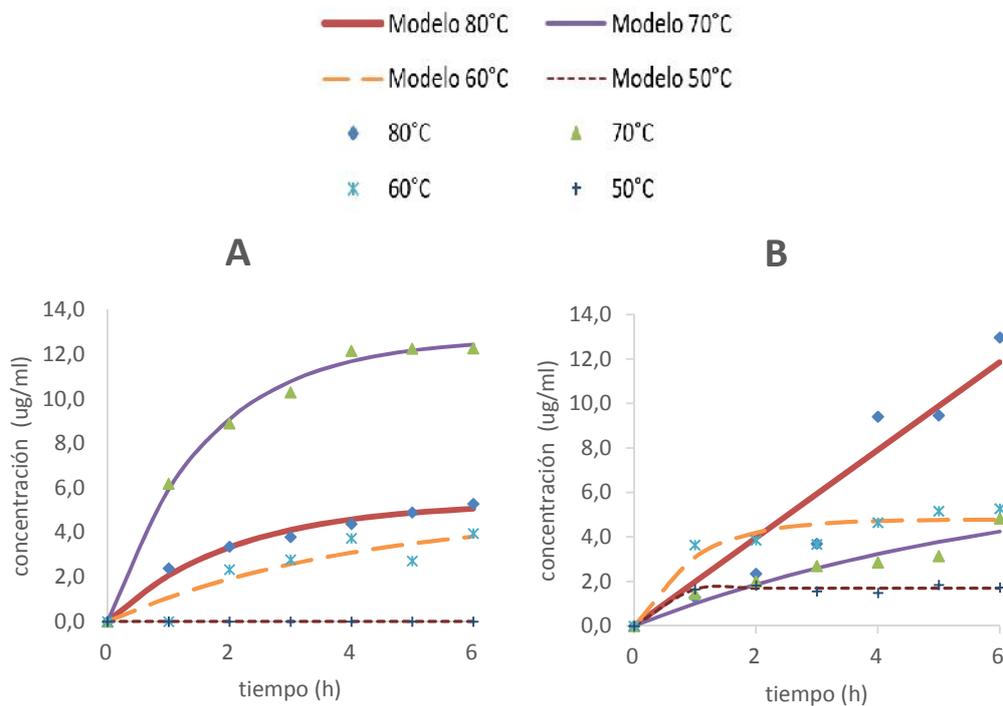


**Figura 3.6.** Curva de calibración de cafeína y teobromina

**Elaborado por:** Fanny Cadena

La curva de calibración se obtuvo mediante regresión lineal donde se determinaron los coeficiente de correlación  $R^2$ . Para una mayor exactitud de las concentraciones a obtener de cada una de las muestras, se seleccionaron las curvas que tienen un mayor coeficiente de correlación, en este caso se optaron por las curvas de calibración las gráficas de la figura 3.6 las cuales son área vs concentración de teobromina y cafeína.

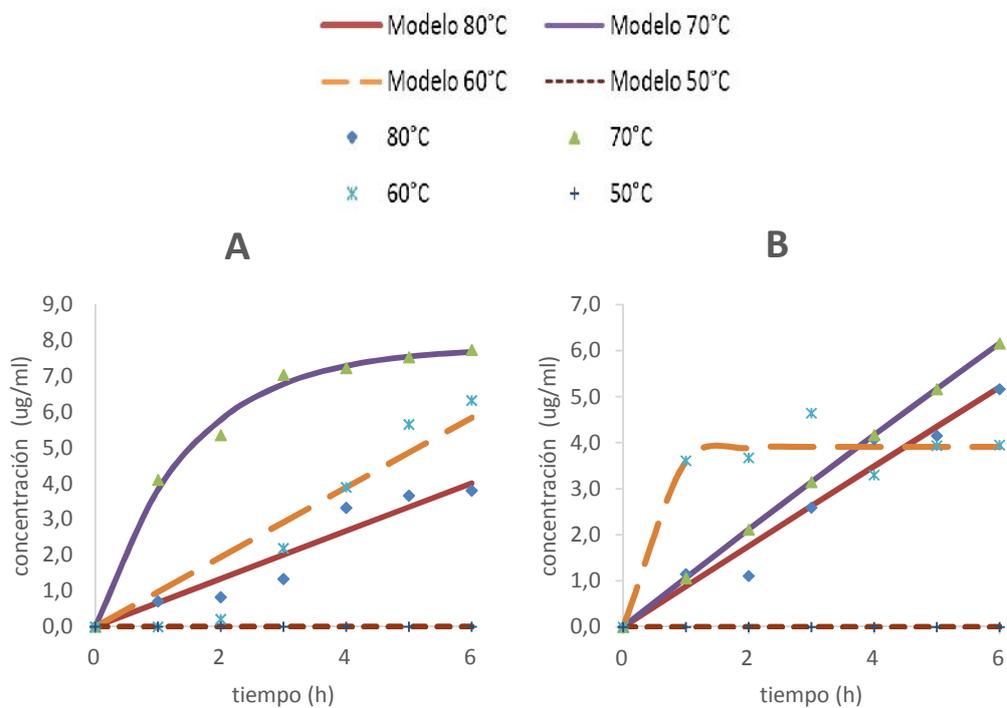
Una vez que se realizaron las extracciones de la corteza y placenta, y se tomaron las lecturas en el equipo de electroforesis, se obtuvieron las concentraciones por medio de la curva de calibración y estas fueron graficadas como se muestra en la figura 3.7 y figura 3.8, que determinaron cómo se comporta la extracción de teobromina y cafeína en las diferentes temperaturas a través del tiempo. Se ajustaron las observaciones al modelo matemático de transferencia de masa por lixiviación a través de una regresión no lineal en el software XLSTAT.



**Figura 3.7.** Resultados experimentales y modelo teórico de las concentraciones de teobromina en: (A) corteza por convección forzada, (B) placenta por convección forzada

**Elaborado por:** Fanny Cadena

Los resultados de las concentraciones de teobromina por convección natural fueron descartados debido a que no se ajustaban al modelo ya antes mencionado.

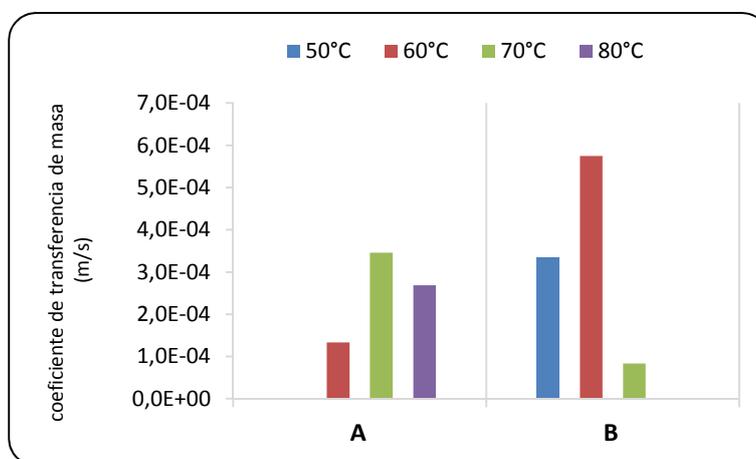


**Figura 3.8.** Resultados experimentales y modelo teórico de las concentraciones de cafeína: (A) corteza por convección forzada (B) placenta por convección forzada.

**Elaborado por:** Fanny Cadena

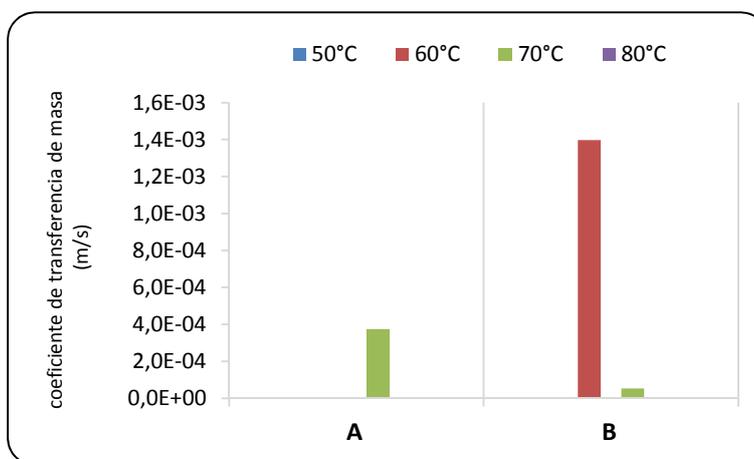
Al igual que los resultados de las concentraciones de teobromina, los resultados de la extracción de cafeína mediante convección natural fueron descartados porque no se ajustan al modelo matemático.

Entre los parámetros del modelo no lineal se estimó el coeficiente de transferencia de masa ( $k_L$ ). En la figura 3.9 se muestran los valores de los coeficientes en la extracción de teobromina en la corteza y placenta y en la figura 3.10 se muestran los coeficientes en la extracción de cafeína de la corteza y placenta.



**Figura 3.9.** Coeficientes de transferencia de masa en extracción de teobromina de: (A) corteza por convección forzada, (B) placenta por convección forzada.

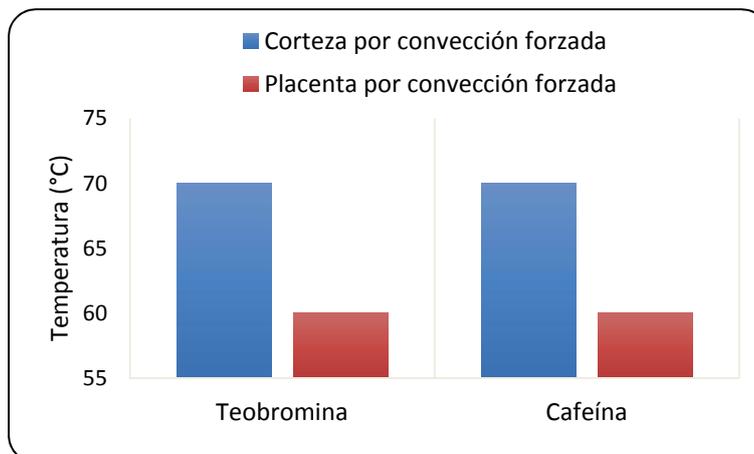
**Elaborado por:** Fanny Cadena



**Figura 3.10.** Coeficientes de transferencia de masa en extracción de cafeína de: (A) corteza por convección forzada, (B) placenta por convección forzada.

**Elaborado por:** Fanny Cadena

Mientras mayor sea el coeficiente de transferencia de masa más eficiente será el proceso de extracción, es por ello que en la figura 3.11 se exponen las temperaturas donde se obtiene un mayor coeficiente de transferencia de masa en las diferentes pruebas realizadas (20).



**Figura 3.11.** Temperaturas óptimas de extracción de teobromina y cafeína

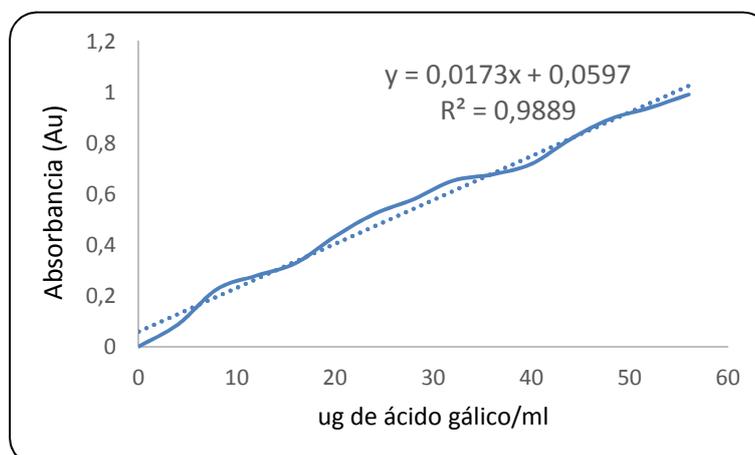
**Elaborado por:** Fanny Cadena

Como se puede observar en la figura 3.11 el proceso de extracción de la teobromina y cafeína se realiza obteniendo mejores resultados por convección forzada. Los dos compuestos se extraen con mayor eficiencia de la corteza a una temperatura de 70°C y de la placenta a 60°C. El tiempo de extracción es de 2 horas ya que en las figuras 3.7 y 3.8 se observa que a partir de las 2 horas de extracción no hay un incremento significativo en la concentración de la teobromina y cafeína.

#### **3.4. Proceso de obtención de flavonoides**

Al igual que en el proceso de obtención de teobromina y cafeína, se elaboró la curva de calibración con el estándar, en este caso el ácido

gálico. Se hizo una regresión lineal como se muestra en la figura 3.12 obteniendo un coeficiente de correlación  $R^2=0.9889$ .

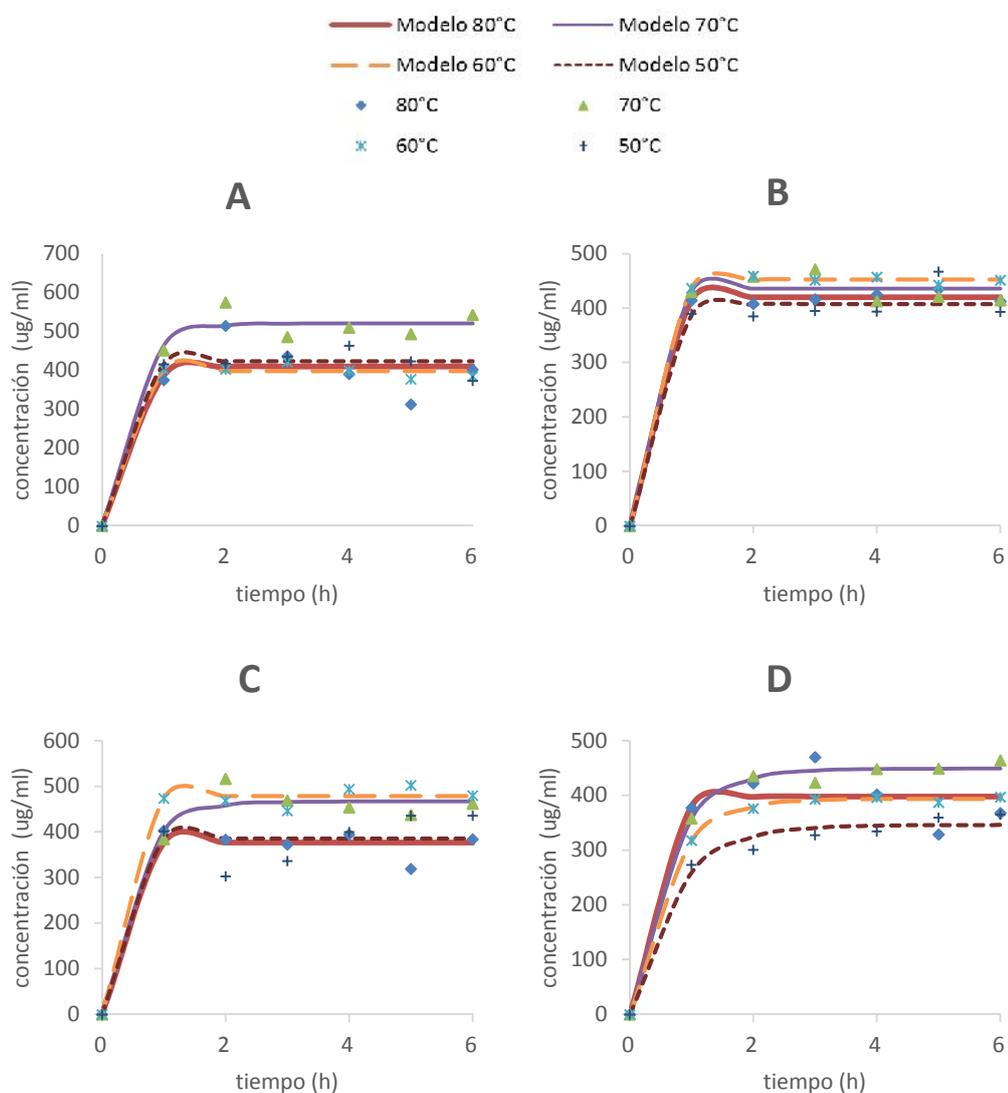


**Figura 3.12.** Curva de calibración del ácido gálico

**Elaborado por:** Fanny Cadena

Luego de realizar las extracciones de la corteza y placenta y siguiendo con el protocolo descrito en el inciso 2.4, se tomaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro para inmediatamente obtener las concentraciones por medio de la curva de calibración.

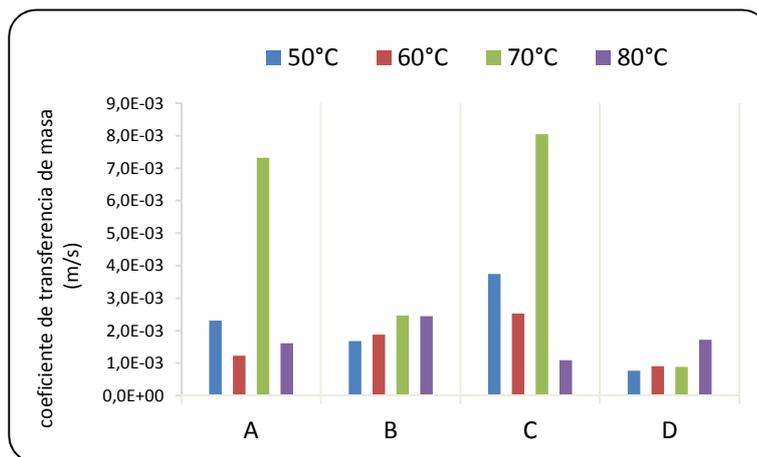
Las observaciones fueron graficadas como se muestra en la figura 3.13 que determina el comportamiento de la extracción de los polifenoles en las diferentes temperaturas a través del tiempo. Se ajustaron las observaciones al modelo matemático de transferencia de masa por lixiviación a través de una regresión no lineal en el software XLSTAT.



**Figura 3.13.** Resultados experimentales y modelo de las concentraciones de polifenoles en: (A) corteza por convección forzada, (B) corteza por convección natural, (C) placenta por convección forzada, (D) placenta por convección natural.

**Elaborado por:** Fanny Cadena

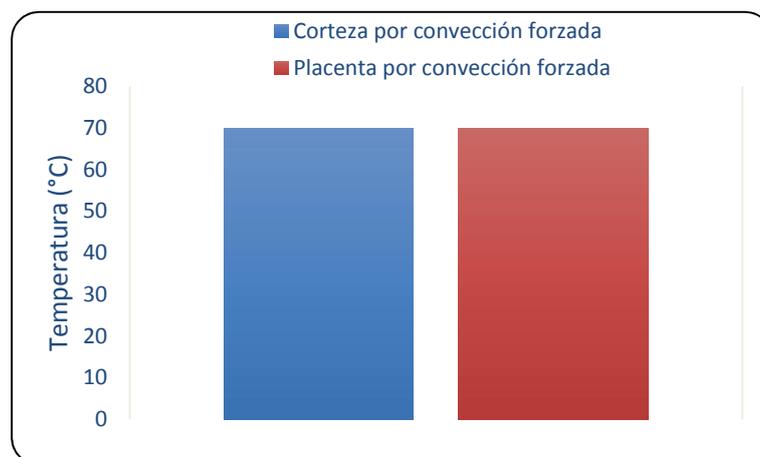
En la figura 3.14 se muestran los valores estimados de los coeficientes de transferencia de masa ( $k_L$ ) de la extracción de polifenoles de la corteza y placenta.



**Figura 3.14.** Coeficientes de transferencia de masa en extracción de polifenoles de: (A) corteza por convección forzada, (B) corteza por convección natural, (C) placenta por convección forzada, (D) placenta por convección natural.

**Elaborado por:** Fanny Cadena

En la figura 3.15 se muestra la temperatura en la cual se extrajo de una manera más eficiente los polifenoles. En la corteza y en la placenta el mayor coeficiente de transferencia de masa se da a una temperatura de 70°C por convección forzada durante 2 horas.

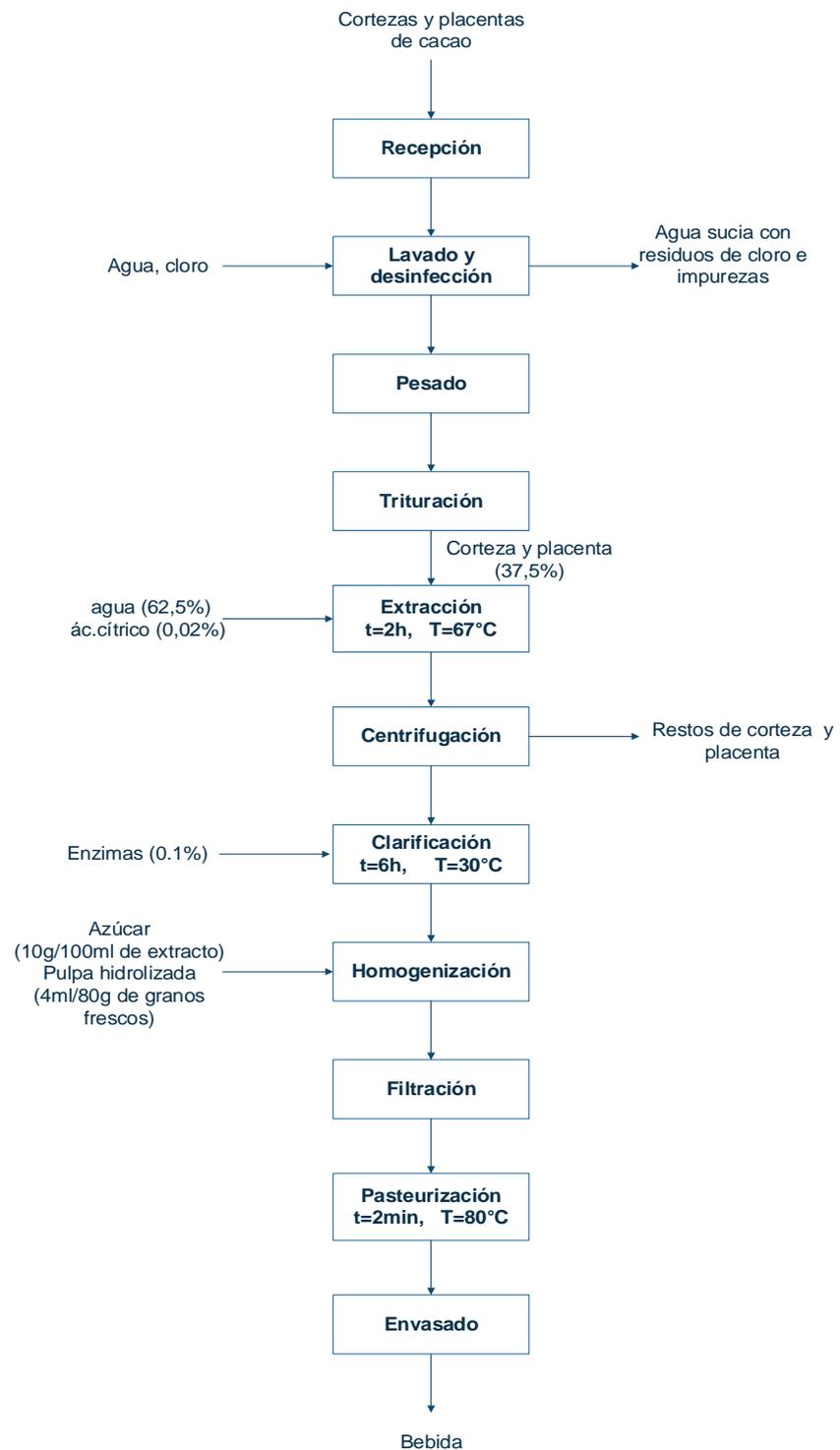


**Figura 3.15.** Temperaturas óptimas de extracción de polifenoles

**Elaborado por:** Fanny Cadena

### 3.5. Obtención de bebida energizante

El diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida energética a partir de los excedentes de cacao se indica en la figura 3.16.



**Figura 3.16.** Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida energética

**Elaborado por:** Fanny Cadena

### **Extracción**

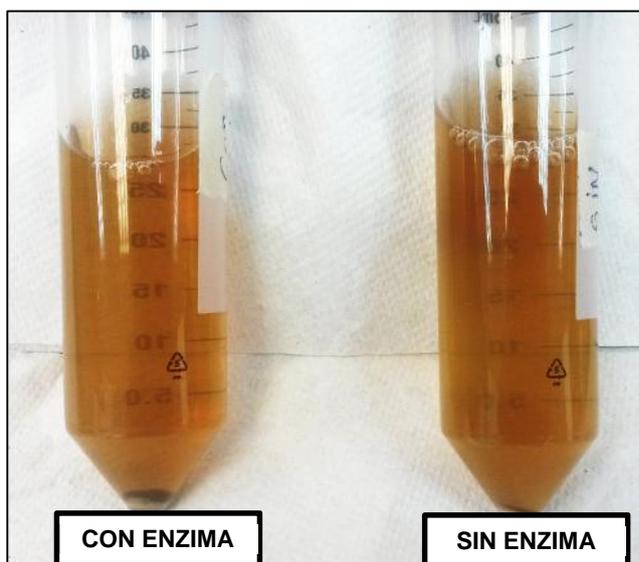
Después de realizado el análisis de la extracción de teobromina, cafeína y flavonoides en los incisos 3.3 y 3.4 se concluyó que la temperatura promedio para poder extraer los tres compuestos es de 67°C, durante 2 horas. El 37,5% era materia prima (34,5% corteza y 3% placenta) y 65,5% agua. Para la materia prima se consideró la proporción en que la corteza y la placenta se encuentran en la mazorca.

### **Clarificación**

En el proceso de extracción además de obtener la teobromina, cafeína y flavonoides, se liberan de los tejidos del cacao otros compuestos como pectina que es la responsable de la viscosidad y turbiedad que se presenta en la bebida. Por lo que fue necesario el uso de la enzima pectinasa al 0.1% a un pH de 4 y una temperatura de 30°C aproximadamente durante 6 horas (45).

En la figura 3.17 se puede notar la diferencia de color entre los dos jugos, uno sin enzima y otro con la acción enzimática. Igualmente en la tabla 8 se muestran los valores de las absorbancias medidas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 630nm, dando como

resultado que el jugo con enzima tiene una menor absorbancia, es decir una clarificación del 34,2%. (8).



**Figura 3.17.** Aplicación de enzimas en el extracto  
**Elaborado por:** Fanny Cadena

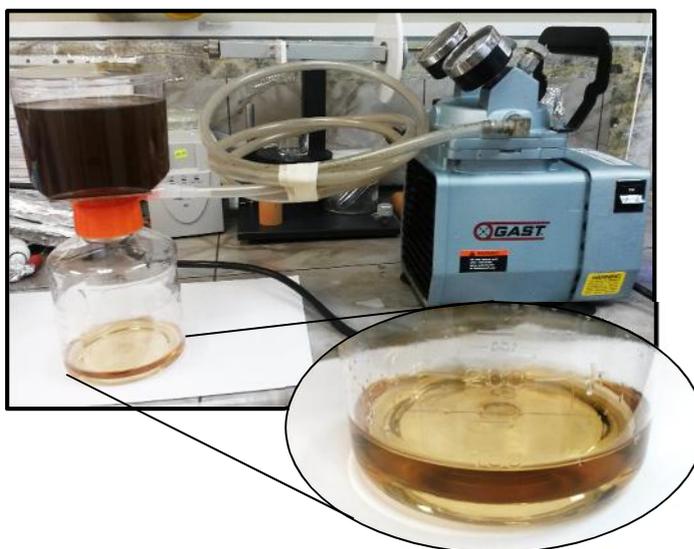
**TABLA 8**  
**ABSORBANCIA DE LAS MUESTRAS**

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>
Sin enzima	0,269
Con enzima	0,177

**Elaborado por:** Fanny Cadena

### Filtración

La bebida clarificada se filtró a una presión de vacío después de haber concluido el tiempo de acción enzimática. Se utilizó una bomba y un filtro de 0,22 $\mu$ m de diámetro de los poros. En la figura 3,18 se muestra el jugo filtrado la cual obtuvo una absorbancia de 0,072, que es mucho menor comparando con bebida no filtrada aumentando así su grado de clarificación.



**Figura 3.18.** Filtración de la bebida

**Elaborado por:** Fanny Cadena

### Pasteurización

Los resultados de la secuenciación de los microorganismos del cacao se presentan en la tabla 9. Con la temperatura de pasteurización, que es de 80°C y con un tiempo de 2 min, es suficiente para destruir a estos microorganismos que causan el deterioro de la bebida (47).

**TABLA 9**  
**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL CACAO**

<b>Nombre</b>	<b>Organismo</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura
<i>Lactobacillus nagellii</i>	Bacteria
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Bacteria
<i>Acetobacter ghanensis</i>	Bacteria

**Elaborado por:** Interdisciplinary Center for Biotechnology Research (ICBR) at the University of Florida.

Los resultados de los análisis microbiológicos en la tabla 10 y tomando como referencia la normativa INEN, demostraron que la bebida es apta para el consumo humano y que a su vez los tratamientos térmicos fueron suficiente para inactivar a los microorganismos causantes de alguna alteración.

**TABLA 10**  
**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA BEBIDA**

<b>Prueba</b>	<b>Unidad</b>	<b>Resultado</b>
Aerobios totales	Ufc/ml	$<1 \times 10^1$
E. coli	Ufc/ml	<1
Coliformes	Ufc/ml	$<1 \times 10^1$
Salmonella	Ufc/ml	<1
Mohos y Levaduras	Ufc/ml	$<1 \times 10^1$

**Elaborado por:** Fanny Cadena

### 3.5.1. Análisis químicos

En la tabla 11 se muestran los resultados de las pruebas químicas realizadas al jugo, los °Brix de la bebida de cacao fueron de 10,6 °Brix. El pH de la fruta está entre 4-5,5, no es una fruta muy ácida, pero fue necesario la adición de ácido cítrico para mejorar la extracción de los compuestos, además se requirió un pH aproximadamente de 4 para la actividad enzimática.

La acidez de la bebida de cacao fue de 0,603 g ácido cítrico/ 100 cm<sup>3</sup> de muestra.

**TABLA 11**  
**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA BEBIDA**

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
°Brix	10,6 ±0,1
pH (20°C)	3,9 ±0,1
Acidez titulable (g ácido cítrico/ 100cm <sup>3</sup> de muestra)	0,603±0,001

**Elaborado por:** Fanny Cadena

### 3.5.2. Análisis sensoriales

En la prueba de determinación del grado de satisfacción con escalas hedónicas verbales como se muestra en la tabla 12, se evaluaron 2 muestras variando su porcentaje de dulzor, la muestra 1 tiene menor dulzor que la muestra 2. Las pruebas se realizaron con la ayuda de 50 jueces en total.

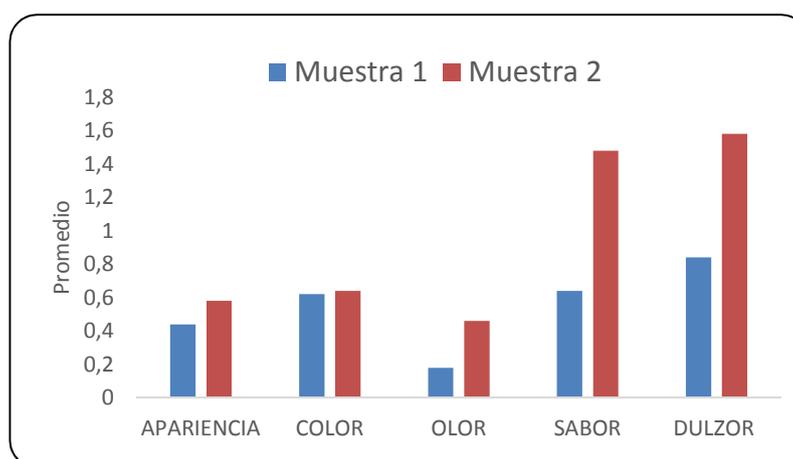
**TABLA 12**  
**ESCALA HEDÓNICA DE SIETE PUNTOS**

<b>Escala</b>	<b>Valor</b>
Me gusta extremadamente	+3
Me gusta mucho	+2
Me gusta ligeramente	+1
Ni me gusta ni me disgusta	0
Me disgusta ligeramente	-1
Me disgusta mucho	-2
Me disgusta extremadamente	-3

**Elaborada por:** Fanny Cadena

En la figura 3.2 se detallan los promedios para cada tratamiento y característica sensorial evaluada. Se demostró que los resultados son positivos en los 5 atributos, aunque los atributos de sabor y dulzor en la muestra 2 tienen un mayor promedio que los demás. Además se

realizaron los análisis estadísticos para determinar si hay diferencia significativa entre las dos muestras considerando cada atributo evaluado.



**Figura 3.19.** Promedios de cada muestra

Elaborado por: Fanny Cadena

**TABLA 13**

**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA APARIENCIA**

Fuente	GL	SC	CM	F calculado	F tabla
Tratamiento	1	0,49	0,49	1,14	4,04
Jueces	49	109,49	2,23	5,21	1,60
Error	49	21,01	0,43		
Total	99	130,99			

Elaborada por: Fanny Cadena

En la tabla 13 se muestra el análisis de varianza, y al comparar el F calculado con el F de la tabla (Apéndice D) se observó que el F calculado es menor que el F de la tabla con un nivel de significancia del 5%; y se pudo decir que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con respecto a su apariencia.

**TABLA 14**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL COLOR**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabla</b>
Tratamiento	1	0,01	0,01	0,02	4,04
Jueces	49	86,81	1,77	4,24	1,60
Error	49	20,49	0,42		
Total	99	107,31			

**Elaborada por:** Fanny Cadena

En la tabla 14, se comparó el F calculado con el F de la tabla y se observó que el F calculado es menor que el F de la tabla con un nivel de significancia del 5%; por lo cual se concluyó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al color de las muestras.

**TABLA 15**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL OLOR**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabla</b>
Tratamiento	1	1,96	1,96	2,46	4,04
Jueces	49	114,76	2,34	2,94	1,60
Error	49	39,04	0,80		
Total	99	155,76			

**Elaborada por:** Fanny Cadena

En la tabla 15, al contrastar el F calculado con el F de la tabla se observó que el F calculado es menor que el F de la tabla con un nivel de significancia del 5%; y se puede concluir que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al olor de las muestras.

**TABLA 16**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL SABOR**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabla</b>
Tratamiento	1	17,64	17,64	20,41	4,04
Jueces	49	91,64	1,87	2,16	1,60
Error	49	42,36	0,86		
Total	99	151,64			

**Elaborada por:** Fanny Cadena

En la tabla 16, al comparar el F calculado de los tratamientos con el F de la tabla se observó que el F calculado es mayor que el F de la tabla a nivel del 5%; por lo tanto, se concluyó que hay diferencia significativa a nivel del 5% entre los tratamientos con respecto al sabor de la bebida.

**TABLA 17**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL DULZOR**

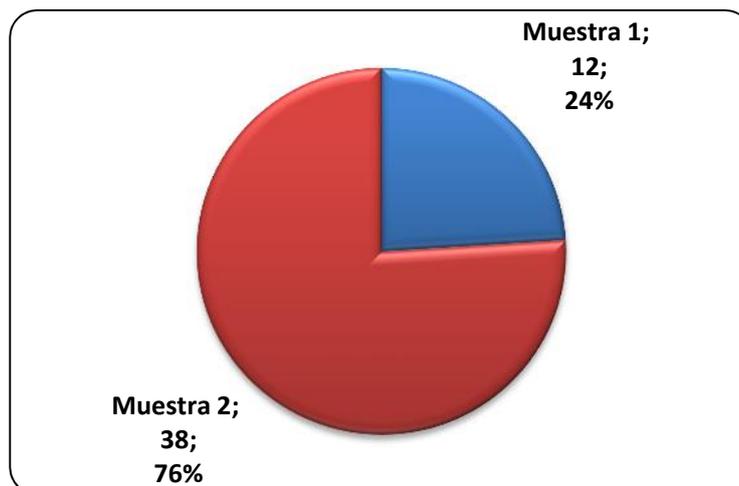
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabla</b>
Tratamiento	1	13,69	13,69	17,74	4,04
Jueces	49	73,09	1,49	1,93	1,60
Error	49	37,81	0,77		
Total	99	124,59			

**Elaborada por:** Fanny Cadena

En la tabla 17, al contrastar el F calculado de los tratamientos con el F de la tabla se observó que el F calculado es mayor que el F de la tabla a nivel del 5%; por lo tanto, se concluyó que hay diferencia significativa a nivel del 5% entre los tratamientos con respecto al dulzor de la bebida.

En la prueba de preferencia, se determinó el número mínimo de respuestas coincidentes para que haya diferencia significativa entre las dos muestras en la tabla del Apéndice E. El número mínimo fue de 33

juicios coincidentes con un nivel de significancia del 5%, entonces se pudo concluir que hay preferencia significativa por la muestra 2 ya que contó con 38 juicios a su favor.



**Figura 3.20.** Resultados de prueba de preferencia  
**Elaborada por:** Fanny Cadena

## Discusión

De los resultados obtenidos en esta investigación sobre la deslipidización, y basándose en la norma INEN 1334-2 que se refiere al rotulado de productos alimenticios para consumo humano, se puede expresar como “cero” el contenido de grasa, logrando así una bebida sin grasa (27).

La extracción de teobromina y cafeína en la corteza se realiza a una temperatura de 70°C la cual es mayor que en la placenta que es a 60°C y esto se debería a que la corteza es más rígida que la placenta demostrando que tiene un mayor porcentaje de celulosa, lo que dificulta el rompimiento de sus estructuras.

Según la norma INEN 2411:2008 el contenido de sustancias de la familia de la cafeína no debe ser menor a 250 mg/L ni mayor a 350 mg/L, las concentraciones obtenidas en el proceso de extracción, no alcanzan el valor mínimo, pero hay que considerar de que se trata de una bebida natural sin añadirle cafeína ni teobromina. Una alternativa para producir bebidas con mayor concentración podría ser la evaporación osmótica o también por medio de la evaporación al vacío sin afectar marcadamente las características sensoriales (2) (17) (22).

Del análisis de los resultados de flavonoides, la concentración de polifenoles totales en el producto final es aproximadamente de 0,88mg/kg de muestra, es decir que la bebida aporta con antioxidantes considerando que no se utiliza la semilla que es la que posee mayor cantidad de flavonoides.

Las bebidas energizantes que se comercializan tienen un pH de entre 2,6-3,3 las cuales son muy ácidas perjudicando a la salud de los consumidores (18). La bebida tiene un pH de 3,9 y conforme a la norma INEN 2337 para las bebidas de frutas, el pH tiene que ser inferior a 4,5, es decir se cumple con la norma (26). Otros estudios realizados señalan que las bebidas refrescantes poseen una acidez de 0,67 g ácido cítrico/100cm<sup>3</sup> y bebidas carbonatadas una acidez de 0,83 g ácido cítrico/ 100cm<sup>3</sup> aproximadamente según la composición, lo que indica que la bebida de cacao es menos ácida que otras bebidas, resultando beneficioso para la salud de los consumidores (5). La acidez toma importancia al momento de elaborar bebidas debido a que influye en la proporción °Brix/Acidez, y esta a su vez en la aceptación del consumidor; conjuntamente ayuda a preservar el jugo (11).

Para extraer el jugo del tamarindo debe hacérselo en extracción acuosa, lo cual baja el contenido de sólidos solubles desde 60 °Brix, que es su °Brix natural, hasta los 18 °Brix en el extracto. Lo mismo sucedería en la bebida de cacao que tiene 14°Brix en la pulpa hidrolizada pero disminuye los °Brix en la bebida a 10,6 (26).

De los microorganismos identificados en la materia prima no se encontraron patógenos debido a la buena manipulación de las mazorcas, además la temperatura de pasteurización supera el límite superior de crecimiento de estos microorganismos (35) (47) .

Los resultados de la evaluación sensorial para la formulación de la bebida energizante, indicaron que la bebida que contiene el mayor grado de dulzor fue la bebida preferida por los panelistas. Pruebas sensoriales realizadas con otro tipo de bebidas, pudieron concluir que conforme aumenta el dulzor y disminuye el pH la aceptabilidad crece, además la percepción de sabores extraños disminuye (41). Sin embargo, algunos panelistas describieron que la apariencia no era tan agradable ya sea por el color, turbidez o la viscosidad que tenía la bebida, por lo que se decidió utilizar el proceso de clarificación por medio de la enzima pectinasa y la microfiltración con el fin de disminuir

la turbidez de la bebida. El incremento en la claridad ocurriría por la degradación de la pectina, ya que se rompen sus matrices en suspensión que normalmente dificultaban la transmisión de luz. La degradación se conseguiría cuando la enzima presenta la carga negativa que envuelve a la pectina con la carga positiva de su núcleo, induciendo la floculación de las partículas para su sedimentación (29).

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se estima que a una temperatura de 60°C se obtiene un proceso más eficiente en la extracción de cafeína y teobromina de la placenta y a 70°C de la corteza en un tiempo de 2 horas por convección forzada. Mientras para la extracción de los flavonoides la temperatura de extracción en la placenta y en la corteza es de 70°C así mismo durante 2 horas por convección forzada.
2. El proceso de pasteurización a 80 °C por dos minutos es suficiente para la inactivación enzimática y la destrucción de los microorganismos causantes de alteraciones en el producto. Además la adición de la enzima pectinasa para la clarificación mejora la apariencia de la bebida.

3. El proceso diseñado permite que el producto cumpla con los niveles microbiológicos de Aerobios totales, *E. coli*, Coliformes, *Salmonella* y Mohos y Levaduras establecidos por la norma INEN.
4. El producto final es aceptado sensorialmente respecto a los diferentes atributos evaluados con una tendencia significativa de consumir una bebida con mayor grado de dulzor.
5. Los parámetros químicos de la bebida como sólidos solubles, acidez titulable y pH se hallan acorde a lo establecido en la normativa INEN. El contenido de cafeína en la bebida se encuentra dentro del límite máximo de la ingesta diaria recomendada por la FDA, aunque la concentración total de cafeína y teobromina no llega al límite mínimo establecido en el INEN para bebidas energizantes.
6. Para obtener una mayor concentración de los alcaloides del grupo de las xantinas se podría realizar una evaporación con presión al vacío para no perder las características sensoriales de la bebida.
7. Futuros estudios a realizarse deberían ser sobre la factibilidad económica para la elaboración de la bebida energética a escala industrial.

8. Se recomienda asegurar la manipulación de la materia prima en un proceso industrial a través de buenas prácticas de manufactura para que no se genere una contaminación cruzada en el producto.

# APÉNDICES

# APÉNDICE A

## TABLA DE DISTRIBUCIÓN F

Apéndice V (Continuación)

		F <sub>α, v1, v2</sub>																					
v <sub>2</sub>	v <sub>1</sub>	Grados de libertad del numerador (v <sub>1</sub> )																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞			
1	1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3			
2	1	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50			
3	1	10.13	9.51	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53			
4	1	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63			
5	1	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36			
6	1	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67			
7	1	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23			
8	1	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93			
9	1	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71			
10	1	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54			
11	1	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40			
12	1	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30			
13	1	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21			
14	1	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13			
15	1	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07			
16	1	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01			
17	1	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96			
18	1	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92			
19	1	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88			
20	1	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84			
21	1	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81			
22	1	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78			
23	1	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76			
24	1	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73			
25	1	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71			
26	1	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69			
27	1	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67			
28	1	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65			
29	1	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64			
30	1	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62			
40	1	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51			
60	1	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39			
120	1	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25			
∞	1	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00			

Nota: F<sub>α, v1, v2</sub> = 1/F<sub>1-α, v2, v1</sub>

## APÉNDICE B

### TABLA DE SIGNIFICANCIA PARA PRUEBAS DE DOS MUESTRAS

Número de juicios	Pruebas bilaterales* Nivel de probabilidad			Pruebas unilaterales** Nivel de probabilidad		
	5%	1%	0.1%	5%	1%	0.1%
5	-	-	-	5	-	-
6	-	-	-	6	-	-
7	7	-	-	7	7	-
8	8	8	-	7	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	-	9	10	10
11	10	11	11	9	10	11
12	10	11	12	10	11	12
13	11	12	13	10	12	13
14	12	13	14	11	12	13
15	12	13	14	12	13	14
16	13	14	15	12	14	15
17	13	15	16	13	14	16
18	14	15	17	13	15	16
19	15	16	17	14	15	17
20	15	17	18	15	16	18
21	16	17	19	15	17	18
22	17	18	19	16	17	19
23	17	19	20	16	18	20
24	18	19	21	17	19	20
25	18	20	21	18	19	21
26	19	20	22	18	20	22
27	20	21	23	19	20	22
28	20	22	23	19	21	23
29	21	22	24	20	22	24
30	21	23	25	20	22	24
31	22	24	25	21	23	25
32	23	24	26	22	24	26
33	23	25	27	22	24	26
34	24	25	27	23	25	27
35	24	26	28	23	25	27
36	25	27	29	24	26	28
37	25	27	29	24	27	29
38	26	28	30	25	27	29
39	27	28	31	26	28	30
40	27	29	31	26	28	31
41	28	30	32	27	29	31
42	28	30	32	27	29	32
43	29	31	33	28	30	32
44	29	31	34	28	31	33
45	30	32	34	29	31	34
46	31	33	35	30	32	34
47	31	33	36	30	32	35
48	32	34	36	31	33	36
49	32	34	37	31	34	36
50	33	35	37	32	34	37
60	39	41	44	37	40	43
70	44	47	50	43	46	49
80	50	52	56	48	51	55

\* Número mínimo de juicios coincidentes necesario para establecer diferencia significativa

\*\* Número mínimo de respuestas correctas necesario para establecer diferencia significativa

Fuente: Roessler y col. 1956

# APÉNDICE C

## ANÁLISIS DE GRASA DE CORTEZA DE CACAO



Escuela Superior Politécnica del Litoral  
Laboratorio PROTAL-ESPOL



Informe: 14-05/0040-M001

GCR -4.1-01-00-03

### Datos del cliente

Nombre: CADENA FIALLOS FANNY CAROLINA	Teléfono: 042820142
Dirección: CDLA GUAYACANES MZ 178, V8	

### Identificación de la muestra / etiqueta

Nombre: Corteza de cacao	Código muestra: 14-05/0040-M001
Marca comercial: S/M	Lote: N/A
Referencia: FRUTAS, VEGETALES Y DERIVADOS	Fecha elaboración: N/A
Envase:	Fecha expiración: N/A
Conservación: Refrigeración 0°C - 4 °C	Fecha recepción: 08/03/2014
Fecha análisis: 08/05/2014	Vida útil: N/A
Contenido neto declarado: N/A	
Contenido neto encontrado: N/R	
Presentaciones: N/A	
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5 °C ± 2.5 °C. Y Humedad Relativa 55% ± 15%	

### Análisis Físico - Químico

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Grasas *	%	0.10	---	AOAC 18TH 989.05 *

Los resultados emitidos corresponden exclusivamente a la muestra proporcionada por el cliente.

Las opiniones / interpretaciones / etc. que se indican a continuación, están FUERA del alcance de acreditación del OAE.

#### \* Observaciones:

Se realizó el análisis bromatológico solicitado por el cliente.  
Los datos bromatológicos se encuentran registrados en el Cuaderno de Cacao y Derivados N° 4, página 509.

Los ensayos marcados con (\*) NO están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE.

\* Representa el Exponente

\* Subcontratado

En microbiología los valores expresados como < 1.8, < 2, < 3, y < 10 se estiman ausencia

La fecha de vencimiento para la validez de los resultados del presente informe (Boletín) es de 360 días a partir de su emisión

Guayaquil, 19 de Mayo del 2014.

Dra. Gloria Bajaña de Pacheco  
Directora General y Gerente Técnico

Ing. María Teresa Amador  
Gerente de Calidad

[www.laboratorioprotal.espol.edu.ec](http://www.laboratorioprotal.espol.edu.ec)

VIGENTE DESDE: 01.07.07

REV. 03

Campus "Destino Salinas II", Rm 305 vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador

Teléfonos: 042 - 269223 / 229 / 238 \* Telefax: 042 - 269233

Facebook: Laboratorio Protal-Espol - Siguenos: @labprotal - rcspolab.espol.edu.ec - labprotal@espol.edu.ec

# APÉNDICE D

## ANÁLISIS DE GRASA DE PLACENTA DE CACAO



Escuela Superior Politécnica del Litoral  
Laboratorio PROTAL-ESPOL



Informe: 14-09/0141-M001

GCR-4.1-01-00-03

### Datos del cliente

Nombre: CADENA FIALLOS FANNY CAROLINA	Teléfono: 042820142
Dirección: CDLA GUAYACANES MZ 178, V8	

### Identificación de la muestra / etiqueta

Nombre: PLACENTAS DE CACAO	Código muestra: 14-09-0141-M001
Marca comercial: S/M	Lote: N/A
Referencia: FRUTAS, VEGETALES Y DERIVADOS	Fecha elaboración: N/A
Envase: N/A	Fecha expiración: N/A
Conservación: Refrigeración 0°C - 4 °C	Fecha recepción: 24/09/2014
Fecha análisis: 24/09/2014	Vida útil: N/A
Contenido neto declarado: N/A	
Contenido neto encontrado: N/R	
Presentaciones: N/A	
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5 °C ± 2.5 °C Y Humedad Relativa 55% ± 15%	

### Análisis Físico - Químicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Grasas *	%	0.65	---	AOAC 18TH 989.05 *

Los resultados emitidos corresponden exclusivamente a la muestra proporcionada por el cliente.

Las opiniones / interpretaciones / etc. que se indican a continuación, están FUERA del alcance de acreditación del OAE.

#### \* Observaciones:

Se realizaron los parámetros bromatológicos solicitados por el cliente.

Los datos bromatológicos se encuentran registrados en el Cuaderno de Vegetales, Frutas y Derivados N° 17 en la página 2738.

Los ensayos marcados con (\*) NO están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE.

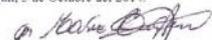
^ Representa el Exponente

\* Subcontratado

En microbiología los valores expresados como < 1.8, < 2, < 3, y < 10 se estiman ausencia

La fecha de vencimiento para la validez de los resultados del presente informe (Boletín) es de 360 días a partir de su emisión

Guayaquil, 3 de Octubre del 2014.

  
Dra. Gloria Bazaña de Pacheco  
Directora General y Gerente Técnico

  
Ing. María Teresa Amador  
Gerente de Calidad



# APÉNDICE E

## FICHA PARA EVALUACIÓN SENSORIAL

Nº panelista: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Producto: **Bebida de cacao**

Pruebe las muestras que se presentan e indique, según la escala su opinión sobre ellas

Marque con X la región que corresponda a la calificación para cada muestra

### MUESTRA: 285

Escala	APARIENCIA	COLOR	OLOR	SABOR	DULZOR
Me gusta extremadamente					
Me gusta mucho					
Me gusta ligeramente					
Ni me gusta ni me disgusta					
Me disgusta ligeramente					
Me disgusta mucho					
Me disgusta extremadamente					
Comentarios.-					
_____					
_____					
_____					

### MUESTRA: 637

Escala	APARIENCIA	COLOR	OLOR	SABOR	DULZOR
Me gusta extremadamente					
Me gusta mucho					
Me gusta ligeramente					
Ni me gusta ni me disgusta					
Me disgusta ligeramente					
Me disgusta mucho					
Me disgusta extremadamente					
Comentarios.-					
_____					
_____					
_____					

Encierre cuál de las dos muestras prefiere:

**285**

**637**

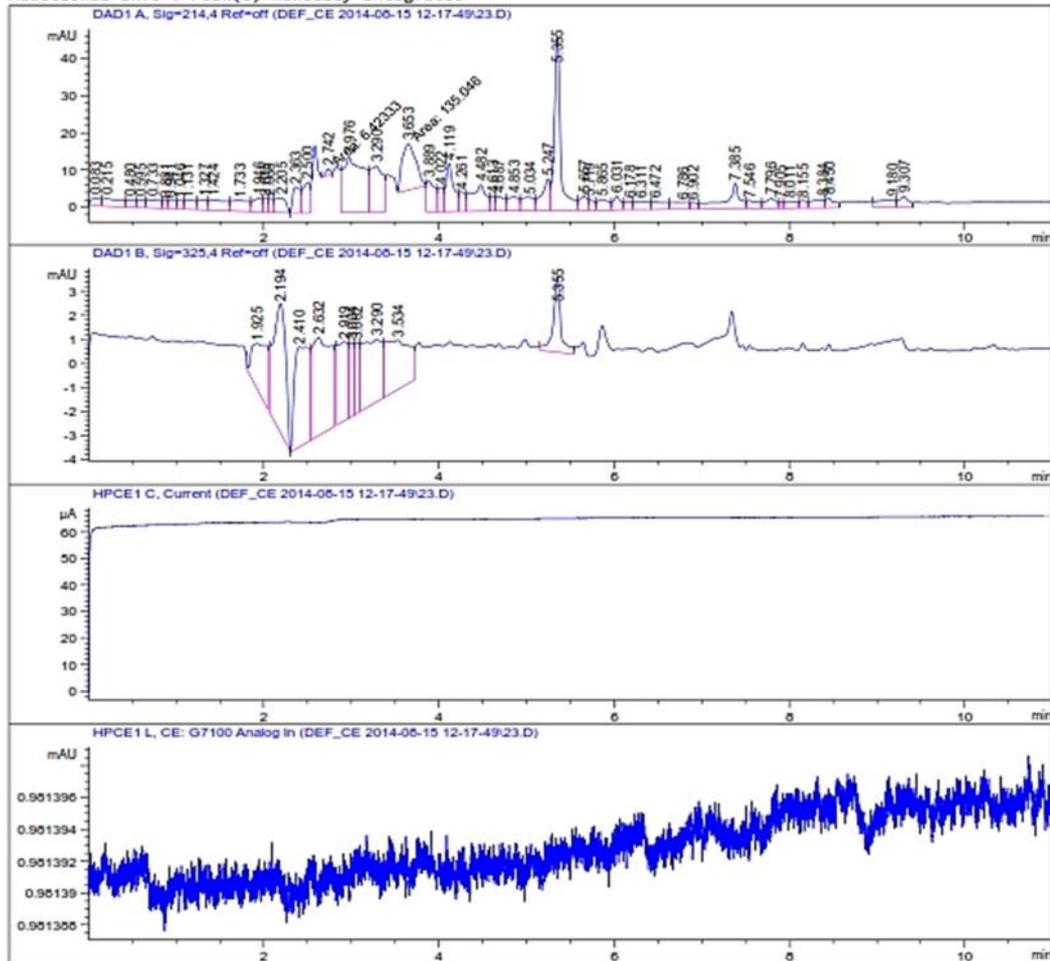
# APÉNDICE F

## REPORTE DE UN EXTRACTO EN EL EQUIPO DE ELECTROFORÉISIS DE CAPILAR

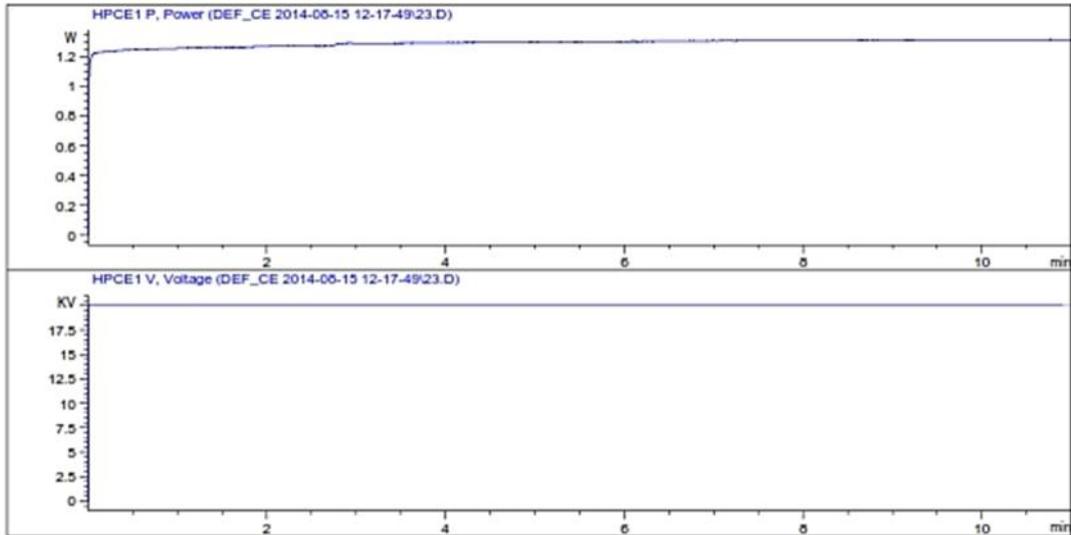
Data File C:\CHEM32\1\DATA\DEF\_CE 2014-08-15 12-17-49\23.D  
Sample Name: 23

```
=====
Acq. Operator   : SYSTEM                               Seq. Line :    6
Acq. Instrument : AGILENT CE7100                       Location  : Vial 34
Injection Date  : 8/15/2014 2:06:55 PM                 Inj       :    1
Method         : C:\CHEM32\1\DATA\DEF_CE 2014-08-15 12-17-49\CAFEINA-TEOBROMINA.M (Sequence
                Method)
Last changed   : 8/15/2014 12:17:49 PM by SYSTEM
Method Info    : metodo para analisis de teobromina y cafeina
=====
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Data File C:\CHEM32\1\DATA\DEF\_CE 2014-08-15 12-17-49\23.D  
 Sample Name: 23



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Area Calculation Mode : Measured Area  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=214,4 Ref=off

Peak #	Time [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.083	BV	0.1228	15.64832	2.05699	0.7716
2	0.215	VB	0.1976	31.30769	2.05626	1.5437
3	0.480	BV	0.0953	14.15240	1.98186	0.6978
4	0.595	VV	0.0802	11.37628	2.00397	0.5609
5	0.733	VV	0.1346	22.83829	2.20962	1.1261
6	0.881	VV	0.0647	9.69604	2.14776	0.4781
7	0.941	VV	0.0822	12.86208	2.20186	0.6342
8	1.046	VV	0.0634	9.83005	2.22945	0.4847
9	1.131	VB	0.1129	20.29936	2.34728	1.0009
10	1.327	BV	0.0929	18.56889	2.61466	0.9156
11	1.424	VV	0.1820	39.13758	2.71829	1.9298
12	1.733	VV	0.1845	40.84545	2.82779	2.0140
13	1.946	VV	0.1020	26.31859	3.56958	1.2977
14	2.015	VV	0.0515	12.51927	3.52111	0.6173
15	2.068	VV	0.0516	12.65317	3.54680	0.6239
16	2.205	VV	0.1432	35.84200	3.82811	1.7673
17	2.363	VV	0.0863	41.79976	6.93896	2.0610
18	2.500	VV	0.0779	44.23981	8.07611	2.1814

Data File C:\CHEM32\1\DATA\DEF\_CE 2014-08-15 12-17-49\23.D  
 Sample Name: 23

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
19	2.742	MM	0.0625	6.42333	1.71413	0.3167
20	2.976	VV	0.1924	232.21562	14.85195	11.4500
21	3.290	VV	0.1344	127.27354	12.33632	6.2756
22	3.653	MM	0.1815	135.04614	12.39859	6.6588
23	3.889	VV	0.0925	57.95701	8.39471	2.8577
24	4.022	VV	0.0671	29.31407	6.44079	1.4454
25	4.119	VV	0.0832	79.49181	13.02289	3.9196
26	4.261	VV	0.0663	24.15163	5.19368	1.1909
27	4.482	VV	0.1541	84.80417	7.06093	4.1815
28	4.613	VV	0.0502	13.06446	3.79270	0.6442
29	4.687	VV	0.0945	26.63957	3.85975	1.3135
30	4.853	VV	0.1184	33.70477	3.76630	1.6619
31	5.034	VV	0.1238	35.04145	3.59144	1.7278
32	5.247	VV	0.0896	56.88085	8.54690	2.8047
33	5.355	VV	0.0729	234.98189	46.56172	11.5864
34	5.657	VV	0.0802	22.52244	3.85325	1.1105
35	5.719	VV	0.0689	14.46237	2.96689	0.7131
36	5.865	VV	0.1248	26.06502	2.84862	1.2852
37	6.031	VV	0.0806	20.93405	3.66638	1.0322
38	6.178	VV	0.0949	15.15779	2.13431	0.7474
39	6.311	VV	0.1525	26.28596	2.21435	1.2961
40	6.472	VB	0.1447	23.01841	2.02352	1.1350
41	6.786	BV	0.1770	25.21971	1.80536	1.2435
42	6.902	VV	0.0746	9.64241	1.79804	0.4754
43	7.385	VV	0.1422	76.27847	6.83427	3.7611
44	7.546	VV	0.1176	19.36037	2.13950	0.9546
45	7.796	VV	0.1250	23.33646	2.59282	1.1507
46	7.905	VV	0.0539	6.82771	1.81372	0.3367
47	8.011	VV	0.1287	18.21651	1.85334	0.8982
48	8.155	VV	0.0783	11.51943	2.02854	0.5680
49	8.384	VV	0.1387	23.19415	2.13507	1.1436
50	8.450	VV	0.0921	17.88438	2.60609	0.8818
51	9.180	VV	0.1814	27.98749	1.90470	1.3800
52	9.307	VV	0.1067	23.24481	2.86452	1.1461
Totals :				2028.08328	258.49253	

Signal 2: DAD1 B, Sig=325,4 Ref=off

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.925	BB	0.1706	24.48243	1.87234	7.2943
2	2.194	BV	0.1533	52.48906	5.40335	15.6386
3	2.410	VV	0.1652	48.06900	4.14800	14.3216
4	2.632	VB	0.1816	58.68390	4.08603	17.4842
5	2.919	BV	0.1056	25.76129	3.28145	7.6753
6	3.004	VV	0.0594	12.96390	3.06440	3.8625
7	3.062	VV	0.0579	11.57434	2.93969	3.4485
8	3.290	VV	0.2026	41.37704	2.58737	12.3278
9	3.534	VV	0.2496	41.22058	2.04117	12.2812
10	5.355	BB	0.0846	19.01723	3.14365	5.6660

Data File C:\CHEM32\1\DATA\DEF\_CE 2014-08-15 12-17-49\23.D  
Sample Name: 23

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
Totals :				335.63878	32.56743	

Signal 3: HPCE1 L, CE: G7100 Analog In

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

## BIBLIOGRAFÍA

1. 3M MICROBIOLOGÍA, Buenas prácticas para el uso de placas petrifilm.
2. ACEVEDO B. y AVANZA J., Concentración por evaporación de jugos de Lima Rangpur, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, 2005.
3. AGUAVIL J., “Elaboración de galletas a partir de la harina de placenta de cacao.” (Tesis, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial, 2012).
4. ALARCON T., “Aprovechamiento de subproductos de cacao CCN-51 para la elaboración de bebida alcoholica a partir del exudado de mucílago con adición de cascarillas irradiadas con UV-C” (Tesis, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial, 2013).
5. AMAMBAL J., “Estudio in vitro del efecto erosivo de las bebidas industrializadas en el esmalte de dientes permanentes humanos”, (Tesis, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2013).

6. ANECACAO, Cacao CCN 51, Recuperado de: <http://www.anecacao.com/es/cacao-ccn-51/>.
7. ANZALDUA A., La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica., Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1994, págs. 70–136.
8. ARRÁZOLA G., ALVIS A. y OSORIO J., Clarificación combinada y evaluación sensorial de jugo de marañón (*Anacardium Occidentale L.*), Revista MVZ Córdoba, 2013, págs. 3722–30.
9. AUSUBEL F. M., BRENT R., KINGSTON K., MOORE D., SEIDMAN J., SMITH J., STRUHL K., Current protocols in molecular biology, 2003.
10. BADUI S., Química de los Alimentos, Cuarta edición, Pearson Educación, México, 2006.
11. BATES R., MORRIS J. y Crandall P., Principles and practices of small - and medium- scale fruit juice processing, Fao agricultural services bulletin 146, 2001.
12. CALLE S., “Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales” (Proyecto final de carrera, Departamento de Química Industrial, Universidad Politécnica de Cataluña, 2011).

13. COTE M., RANGEL C., SÁNCHEZ M. y MEDINA A., Bebidas Energizantes: ¿hidratantes o estimulantes?, Revista Facultad de Medicina, volumen 59, 2011, págs. 255–66.
14. CUBILLOS G., MERIZALDE G. y CORREA E., Manual de beneficio del cacao, Medellín, Colombia, 2008.
15. ESPINOZA J.D., VARGAS A., ROBLES V.J., RODRÍGUEZ G.C. y GARCÍA M.A., Mathematical modeling of caffeine kinetic during solid – liquid extraction of coffee beans, Journal of Food Engineering 81, 2006, págs. 72–78.
16. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, Theobromine, 2005, págs. 2554–55.
17. FORERO F. y VÉLEZ C., Optimización de la concentración por evaporación osmótica del jugo de maracuyá (*Passifora Edullis*), Revista de ingeniería Dyna. Medellín, Colombia, 2013, págs. 90–98.
18. FRESNO M., ANGEL P., ARIAS R. y MUÑOZ A., Grado de acidez y potencial erosivo de las bebidas energizantes disponibles en Chile, 2013, págs. 5–7
19. GARCÍA C., Nueva York investiga las bebidas energéticas por falsos reclamos, El país, 2012.
20. GEANKOPLIS C., Procesos de Transporte Y Operaciones Unitarias, Tercera edición, México, 1998, págs. 800–807.

21. GRACIA M., Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales, Universidad Autónoma de Querétano, 2007.
22. INEN, Norma Técnica Ecuatoriana: Bebidas Energéticas. Requisitos, NTE INEN 2411, Primera edición, Quito-Ecuador, 2008.
23. INEN, Norma Técnica Ecuatoriana: Bebidas Gaseosas, determinación de la acidez titulable. NTE INEN 1091, Primera edición, Quito-Ecuador 1983.
24. INEN, Norma Técnica Ecuatoriana: Chocolates, Requisitos. NTE INEN 621, Primera edición, Quito-Ecuador, 2010.
25. INEN, Norma Técnica Ecuatoriana: Conservas Vegetales, Determinación de sólidos solubles, método refractométrico. NTE INEN 380, Primera edición, Quito-Ecuador, 1985
26. INEN, Norma Técnica Ecuatoriana: Jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos. NTE INEN 2337, Primera edición, Quito-Ecuador, 2008.
27. INEN, Norma Técnica Ecuatoriana: Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 2. Rotulado Nutricional. Requisitos. NTE INEN 1334, Primera edición, Quito-Ecuador, 2011

28. KALVATCHEV Z., GARZARO D. y GUERRA F., Theobroma Cacao L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud, Revista Agroalimentaria, volumen 6, 1998, págs. 23–25.
29. KASHYAP D., VOHRA P., CHOPRA S. y TEWARI R., Applications of pectinases in the commercial sector: a review, Bioresource Technology 77, 2001, págs. 215–27.
30. KIRK R., SAWYER R. y EGAN H., Composición y análisis de alimentos de Pearson, Segunda edición, Compañía editorial continental, México, 2004.
31. LIENDO, RIGEL, Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos., Tecnología postcosecha, 2005, 2–4
32. LUZURIAGA D., “Extracción y aprovechamiento del mucílago de cacao como materia prima en la elaboración de vino”. (Tesis, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial, 2012).
33. MCGLYNN W., Guía para el uso de cloro como desinfectante en el procesamiento de alimentos., Mundo Alimentario, 2007, págs. 20–21.
34. MELGAREJO M., El verdadero poder de las bebidas energéticas, Revista Enfasis alimentación N°6, 2004.

35. MOYANO C., LEÓN J., MARCHELLI E., GONZÁLEZ J. y BETANCURT P., Jugo natural integral de manzana, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, 1981.
36. MPBIO, Pectinase Catalog Number: 151803, 198979”
37. OLIVERAS J M., La elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica, Técnica Industrial 268, 2007, págs. 47–51.
38. PLÚA J C., “Diseño de una línea procesadora de pasta de cacao artesanal.” (Tesis, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2008).
39. PRO ECUADOR, Análisis del sector de cacao y elaborados, 2013.
40. PRO ECUADOR, Cacao y Elaborados Recuperado de: <http://www.proecuador.gob.ec/exportadores/sectores/cacao-y-elaborados/>.
41. QUIMBITA F., RODRIGUEZ P. y VERA E., Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos, Revista Tecnológica ESPOL, volumen 26, 2013, págs. 8–15.
42. ROUSSOS A.,FRANCHELLO A., FLAX F., DE LEO M, LAROCCA T., BARBEITO S., y otros, Bebidas Energizantes Y Su Consumo En Adolescentes, Revista de pediatría y nutrición, volumen 10, 2009, págs.124–29.

43. SIGMA-ALDRICH, Product Information: Caffeine, pág. 750.
44. SUÁREZ D., Guía de procesos para la elaboración de néctares, Mermeladas, uvas pasas y vinos., Ciencia Y Tecnología N° 115, Bogotá, 2003.
45. TAPRE A. y JAIN R., Pectinases : Enzymes for fruit processing industry, International Food Research Journal, volumen 21, 2014, págs. 447–53.
46. TASSINARY J., BIANCHETTI P., REMPEL C. y STÜLP S., Evaluation of effects to the therapeutical ultrasound on caffeine and the release in vertical, Artígo, volumen 34, 2011, págs. 1539–43.
47. TORTORA G J., FUNKE B R., y CASE C L., Introducción a la Microbiología, Novena edición, Médica Panamericana, Buenos Aires, 2007.
48. VALENZUELA A., El Chocolate, un placer saludable., Revista chilena de nutrición, volumen 34, 2007.
49. VÉLEZ M., Técnicas de Análisis Químico de Alimentos.
50. VILLAGÓMEZ S., “Optimización y aprovechamiento del residuo (exudado del mucílago) de la almendra fresca del cacao (*Theobroma Cacao L.*) CCN51 en la elaboración de vinagre.” (Tesis, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial, 2013).

51. VILLAREAL Y., MEJÍA D., OSORIO O. y CERÓN A., Características sensoriales y contenido de vitamina c en jugos de frutas., Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial., volumen 11, 2013, págs. 66–75.