



**TESIS DOCTORAL**

**REVALORIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE DISTINTAS  
VARIEDADES DE CACAO DE ECUADOR PARA LA  
MEJORA DE LA CALIDAD Y LA SEGURIDAD DE  
ALIMENTOS**

**D. José Vicente Villarroel Bastidas**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS  
ALIMENTOS**

Conformidad de la directora y codirectores

**Alicia Rodríguez Jiménez, Alejandro Hernández León y Juan Neira Mosquera**

Esta tesis cuenta con la autorización de la directora y codirectores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

**2024**



## AGRADECIMIENTO

A mis padres por sus consejos y enseñanzas han ayudado a ser la persona que soy hoy. Por inculcarme valores como la honestidad, el esfuerzo y el respeto. Gracias a ellos, he aprendido a tomar mis propias decisiones y a ser responsable de mis actos. Siempre han estado ahí para mí, en los buenos y en los malos momentos. Su amor y apoyo incondicional me han dado la fuerza para superar cualquier obstáculo. Por el apoyo brindado en todo lo que he querido realizar. Gracias a ellos, he podido alcanzar mis metas y seguir creciendo como persona.

A mis hijos, Sebastián y Samantha, quiero agradecerles por ser la fuente de fortaleza que me ha impulsado a cumplir con mis objetivos. Su amor y apoyo incondicional me han dado la fuerza para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles como la pandemia donde perdimos seres queridos y amigos. Sé que seré un modelo para ustedes en el futuro, y quiero que sepan que siempre estaré ahí para ustedes, para guiarlos y apoyarlos en sus sueños.

A mi esposa, Zaira, quiero agradecerte por estar constantemente apoyándome en todos mis proyectos. Gracias a tu amor y comprensión, he podido alcanzar mis metas y seguir creciendo como persona. Eres mi mejor amiga, mi compañera de vida y el amor de mi vida. A toda mi familia, quiero agradecerles por estar siempre ahí para mí. Sus consejos y palabras de aliento me han ayudado a ser la persona que soy hoy.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento por la apertura de los laboratorios para el desarrollo de mi tesis doctoral. Su apoyo ha sido fundamental para el éxito de mi investigación.

A mi directora de tesis, Dra. Alicia Rodríguez, quiero agradecerle de todo corazón por su orientación, consejos y correcciones. Su apoyo ha sido invaluable para el desarrollo de mi investigación. Sus conocimientos y experiencia me han permitido crecer como profesional y como persona. Gracias a su guía, he podido alcanzar una meta muy importante en mi vida.

Al doctor Alejandro Hernández León, quiero agradecerle por su conocimiento, paciencia y dedicación en la revisión de mi documento. Su aporte científico ha sido fundamental para concluir la investigación con éxito. Agradezco su disposición a ayudarme y su compromiso con el rigor académico. Su apoyo ha sido un ejemplo para mí.

A la doctora María de Guía Córdoba, quiero agradecerle por su apoyo desde los primeros pasos de mi investigación. Su orientación me ha permitido estructurar el proyecto de forma clara y coherente. Su colaboración constante ha sido fundamental para el desarrollo de mi investigación. Gracias a su apoyo, he podido avanzar de forma rápida y eficiente.

Al doctor Juan Neria, quiero agradecerle por su apoyo brindado todos estos años dentro y fuera de la Universidad. Gracias a su apoyo, he podido superar los desafíos y alcanzar mis metas.

*Exígete mucho a ti mismo y espera poco de los demás. Así te ahorrarás disgustos (Confucio)*

*La paciencia es amarga, pero su fruto es dulce (Jean-Jacques Rousseau)*



# ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>II.1.1. Productividad agrícola y pobreza rural</b> .....	8
<b>II.2. INDUSTRIA ALIMENTARIA</b> .....	9
<b>II.2.1. LA SOBERANÍA ALIMENTARIA</b> .....	9
<b>II.2.2. SEGURIDAD ALIMENTARIA</b> .....	9
<b>II.2.2.1. Componentes de la seguridad alimentaria</b> .....	10
<b>II.2.2.2. La inseguridad alimentaria</b> .....	11
<b>II.2.3. CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA DE ECUADOR</b> .....	11
<b>II.3. PRODUCTOS VEGETALES CON ESCASA REVALORIZACIÓN</b> .....	12
<b>II.3.1. LAS CADENAS DE VALOR</b> .....	12
<b>II.3.2. VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS</b> .....	13
<b>II.3.3. PRINCIPALES CULTIVOS DE ECUADOR</b> .....	14
<b>II.4. CACAO (<i>THEOBROMA CACAO</i> L.)</b> .....	15
<b>II.4.1. VARIETADES DE CACAO CULTIVADAS EN ECUADOR</b> .....	18
<b>II.4.2. SUBPRODUCTOS DEL CACAO. EXTRACCIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO</b> .....	19
<b>II.4.2.1. Subproductos del cacao y sus aplicaciones</b> .....	24
<b>III. Objetivos</b> .....	53
<b>III.1. Objetivo General</b> .....	54
<b>III.2. Objetivos específicos:</b> .....	54
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	55
<b>IV.1. Diseño experimental</b> .....	56
<b>IV.2. Productos obtenidos con mucílago de cacao</b> .....	58
<b>IV.2.1. Origen y extracción del mucílago de cacao</b> .....	58
<b>IV.2.1.2. Análisis</b> .....	59
<b>IV.2.2. Producción de bioetanol a partir de residuos de cacao</b> .....	59
<b>IV.2.2.1. Diseño experimental y etapas de la producción de bioetanol</b> .....	59
<b>IV.2.2.2. Análisis:</b> .....	61
<b>IV.2.3. Elaboración de bebidas fermentadas de naranja y carambola con adición de mucílago de cacao</b> .....	61
<b>IV.2.3.1. Diseño experimental y etapas de la elaboración de las bebidas fermentadas de frutas</b> .....	62
<b>IV.2.3.2. Muestreo y análisis:</b> .....	64

<b>IV.2.4. Elaboración de bebidas fermentadas a base de té con adición de mucílago de cacao .....</b>	<b>64</b>
<b>IV.2.4.1. Diseño experimental y etapas de la elaboración de las bebidas fermentadas de té.....</b>	<b>65</b>
<b>IV.2.4.2. Muestreo y análisis:.....</b>	<b>67</b>
<b>IV.2.5. Elaboración de cervezas artesanales con mucílago de cacao.....</b>	<b>67</b>
<b>IV.2.5.1. Diseño experimental y etapas de la elaboración de la cerveza artesanal con mucílago de cacao.....</b>	<b>67</b>
<b>IV.2.5.2. Muestreo y análisis:.....</b>	<b>71</b>
<b>IV.2.6. Bioconservación de carne mediante mucílago de cacao.....</b>	<b>72</b>
<b>IV.2.6.1. Diseño experimental y etapas de la preparación de las muestras de carne con mucílago de cacao.....</b>	<b>72</b>
<b>IV.2.6.2. Muestreo y análisis:.....</b>	<b>74</b>
<b>IV.3. Análisis.....</b>	<b>74</b>
<b>IV.3.1. Determinación de parámetros fisicoquímicos.....</b>	<b>74</b>
<b>IV.3.1.1. Determinación del pH para líquidos.....</b>	<b>74</b>
<b>IV.3.1.1.1. Determinación del pH para sólidos.....</b>	<b>74</b>
<b>IV.3.1.2. Determinación de la acidez titulable para líquidos .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.3.1.2.1. Determinación de la acidez titulable para sólidos .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.3.1.3. Determinación del contenido en sólidos en suspensión .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.3.1.4. Determinación del contenido de sólidos solubles totales.....</b>	<b>75</b>
<b>IV.3.1.5. Determinación del contenido de humedad .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.3.1.6. Determinación del grado alcohólico.....</b>	<b>76</b>
<b>IV.3.1.7. Determinación de densidad .....</b>	<b>76</b>
<b>IV.3.1.8. Determinación de la turbidez .....</b>	<b>76</b>
<b>IV.3.1.9. Determinación del calor específico.....</b>	<b>76</b>
<b>IV.3.1.10. Determinación de la potencia de combustión.....</b>	<b>76</b>
<b>IV.3.1.11. Determinación de la transmitancia y absorbancia .....</b>	<b>77</b>
<b>IV.3.1.11. Análisis del color .....</b>	<b>77</b>
<b>IV.3.1.12. Determinación de la cantidad de espuma.....</b>	<b>77</b>
<b>IV.3.1.13. Determinación del grado de amargor.....</b>	<b>77</b>
<b>IV.3.1.14. Determinación de la capacidad de retención de agua .....</b>	<b>78</b>
<b>IV.3.1.15. Determinación de la textura .....</b>	<b>78</b>
<b>IV.3.2. Análisis microbiológicos.....</b>	<b>78</b>
<b>IV.3.3. Análisis sensorial.....</b>	<b>79</b>
<b>IV.3.3.1. Bebidas fermentadas de naranja y carambola con adición de mucílago de cacao .....</b>	<b>79</b>

IV.3.3.2. Bebidas fermentadas de té con adición de mucílago de cacao.....	80
IV.3.3.3. Cerveza artesanal con adición de mucílago de cacao.....	80
IV.3.4. Tratamiento estadístico .....	81
IV.3.4.1. Caracterización del mucílago de cacao.....	81
IV.3.4.2. Producción de bioetanol a partir de residuos de cacao .....	81
IV.3.4.3. Elaboración de bebidas fermentadas de naranja y carambola con adición de mucílago de cacao.....	82
IV.3.4.4. Elaboración de bebidas fermentadas a base de té con adición de mucílago de cacao .....	82
IV.3.4.5. Elaboración de cervezas artesanales con mucílago de cacao.....	82
IV.3.4.6. Bioconservación de la carne mediante mucílago de cacao.....	82
V. Resultados y Discusión .....	83
V.1. Caracterización del mucílago de cacao .....	84
V.2. Producción de bioetanol .....	85
V.2.1. Parámetros fisicoquímicos .....	86
V.3. Elaboración de bebidas fermentadas de frutas .....	94
V.3.1. Parámetros físico-químicos y composición.....	95
V.3.2. Parámetros sensoriales .....	106
V.4. Elaboración de kombucha.....	107
V.4.1. Parámetros fisicoquímicos y composición .....	108
V.4.2. Parámetros microbiológicos.....	119
V.4.3. Parámetros sensoriales .....	120
V.5. Elaboración de cerveza artesanal.....	121
V.5.1. Análisis físico-químicos.....	122
V.5.2. Análisis microbiológicos .....	136
V.5.3. Análisis sensorial.....	136
V.6. Bioconservación de las carnes.....	138
V.6.1. Parámetros físico-químicos .....	140
V.6.2. Análisis microbiológico .....	148
VI. Conclusiones .....	150
VII. Bibliografía .....	151

## **I. RESUMEN**

## RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los productos más importantes de Ecuador, tanto por su valor económico como por su valor cultural. Ecuador es uno de los principales productores de cacao del mundo, destacando la variedad nacional, denominada Fino de Aroma, con una producción anual que supera las 200.000 toneladas. Otra de las variedades más ampliamente cultivada es la variedad CCN-51, aunque se le atribuye una calidad inferior. Uno de los principales problemas en la producción de cacao es el alto nivel de subproductos y residuos que se genera, ya que la producción de semilla de cacao está entorno al 14% de peso de la mazorca de cacao. Entre los subproductos y residuos derivados del cacao destacan en orden de importancia cuantitativa la cáscara de la mazorca del cacao, la cáscara de la semilla y el mucílago, también conocido como exudado, pulpa, agua de cacao o miel de cacao. Actualmente el nivel de revalorización de estos subproductos en Ecuador es muy bajo, y generalmente se utiliza para la alimentación animal o se destruye o entierra. La generación de este elevado volumen de residuos y subproductos supone enormes problemas de índole ambiental, por lo que es necesario valorizar estos subproductos para mejorar su gestión además de dar valor añadido que revierta en los agricultores ecuatorianos.

Dentro de los usos de los subproductos del cacao nos encontramos la generación de energía, la producción de biocombustibles, usos para la biorremediación, extracción de sus componentes (principalmente fibra y polifenoles), y su aplicación como ingrediente en alimentación animal y humana. De los tres principales subproductos del cacao como son la vaina del cacao, la cáscara de la semilla del cacao y el mucílago, este último es el más infrutilizado y, por ello, ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. La obtención del mucílago de cacao, comienza tras la separación de la vaina de la mazorca del cacao, tras la que comienza una fermentación natural de la pulpa del cacao que recubre las semillas, conveniente para mejorar los aromas de las semillas del cacao. En esta fermentación, gobernada por levaduras, bacterias ácido-lácticas (BAL) y bacterias ácido-acéticas, se produce una paulatina licuefacción de la pulpa del cacao debido a los procesos enzimáticos autolíticos y microbianos que se van produciendo durante su obtención. Una vez producida la fermentación, el proceso de obtención del cacao continúa con la pasteurización del conjunto de pulpa y semillas para inactivar los microorganismos. En este punto es donde se obtiene el mayor porcentaje del mucílago del cacao. El producto resultante es un líquido viscoso, de carácter hialino y que se está empezando a utilizar en la producción de bebidas alcohólicas, jalea, gelatinas, mermeladas y otros productos alimentarios. El mucílago del cacao es rico en carbohidratos y fibra, contiene aproximadamente un 10% de proteínas, y contiene minerales. Además, el mucílago de cacao tiene propiedades antioxidantes debido a la presencia de compuestos con estas características entre los que destacan los polifenoles.

En este contexto, la revalorización del mucílago de cacao se presenta como una oportunidad para impulsar el desarrollo sostenible de la industria alimentaria en Ecuador y para promover la conservación de la biodiversidad y los recursos naturales del país. La revalorización del mucílago de cacao puede contribuir a mejorar la calidad y la seguridad de los alimentos, así como a generar nuevas oportunidades de negocio para los productores de cacao en Ecuador. En este sentido, se han llevado a cabo diferentes estudios para analizar las propiedades nutricionales y funcionales del mucílago de cacao, así como para desarrollar nuevas tecnologías y procesos de producción que permitan aprovechar al máximo este recurso. Por todo lo anterior, el objetivo principal de la Tesis Doctoral fue revalorizar el mucílago del

cacao mediante su empleo para la producción de biocombustible y reformulación de diferentes alimentos. Como objetivos específicos se ha pretendido evaluar la idoneidad del mucílago del cacao para producir bioetanol, elaborar bebidas fermentadas a base de frutas, kombucha y cerveza, parafinalmente utilizar el mucílago del cacao para prolongar la vida útil de diferentes tipos de carnes por sus propiedades bioconservantes. Para este propósito se utilizó mucílago de cacao de las dos principales variedades de cacao que se producen en Ecuador, las variedades Fino de Aroma y CCN-51. Este mucílago fue caracterizado por sus propiedades físico-químicas y ópticas. Los resultados mostraron que el mucílago CCN-51 presentó un pH más bajo (pH 4,17) asociado a un mayor % de acidez (1,06 % de ácido láctico). El contenido en sólidos solubles totales fue superior en el mucílago Fino de Aroma con 15,5°Brix. El mucílago Fino de Aroma presentó una coloración ámbar claro asociado a una mayor luminosidad ( $L^*=46,06$  unidades), menor color rojo (coordenada  $a^*=8,11$  unidades) y mayor color amarillo (coordenada  $b^*=30,41$ ), mientras que el mucílago CCN-51 presentó un color ámbar oscuro.

En cuanto al primero de los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral, la generación de bioetanol; se desarrolló un diseño experimental basado en la evaluación de dos mucílagos de cacao, de las variedades Fino de Aroma y CCN-51, tanto en estado sólido como líquido, además de evaluar la influencia de los niveles de inóculo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (0%, 0,01% y 0,05% de inóculo). El bioetanol fue sometido a diferentes análisis para determinar sus características fisicoquímicas. El bioetanol producido presentó como características más relevantes unos valores medios de densidad de 0,93 g/cm<sup>3</sup>, turbidez 5,84 NTU y 0,97 kJ/Kg °C de calor específico, mientras que 0,96 kJ/Kg °C se observaron para CCN-51. Los grados alcohólicos obtenidos tras la fermentación fueron 57,50% para la variedad Fino de Aroma y 51,50% para CCN-51 que fueron dependientes del porcentaje del inóculo de levadura añadido, obteniendo los mejores resultados con un inóculo del 0,05% respecto al 0,01%. Finalmente, lo más destacado fue que la variedad CCN51 alcanzó un valor de rendimiento de 535 mL y el cacao Fino de Aroma 492,50 mL.

Como segundo objetivo específico se ha planteado el uso de mucílago de cacao para la elaboración de bebidas fermentadas a base de frutas. El diseño experimental de este trabajo consistió en evaluar la combinación de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 en concentraciones del 10 y 15% con zumos de naranja y carambola. Tras la fermentación de estos productos se evaluó su calidad mediante el análisis de pH, acidez, contenido en sólidos solubles totales, grados de alcohol, densidad, transmitancia, absorbancia y sólidos en suspensión y análisis organolépticos. El tipo de fruta fue el factor que, de forma significativa, más afectó a los resultados, específicamente a los parámetros de pH, acidez, sólidos solubles totales, absorbancia, transmitancia y grado alcohólico. Es destacable este último parámetro, en el que la bebida elaborada con carambola presentó un volumen alcohólico del 14,8°, mientras que la naranja fue de 8,2°. La variedad de cacao no tuvo influencia significativa en los parámetros evaluados, aunque la concentración influyó en la acidez, sólidos solubles totales y grados alcohólicos. Finalmente, hay que señalar que los datos sensoriales mostraron una adecuada aceptación de estas bebidas fermentadas con frutas y mucílago de cacao, ya que en los atributos de color, aroma y sabor de todas las combinaciones se obtuvieron puntuaciones medias superiores a 6.

Al igual que con bebidas fermentadas de frutas, se ha evaluado la elaboración de bebidas fermentadas con SCOBY a base de té con adición de mucílago de cacao. El SCOBY es una mezcla simbiótica de bacterias y levaduras que se utiliza para fermentar el té y producir una

bebida fermentada denominada kombucha. Al evaluar la aplicación de mucílago de cacao de la variedad CCN-51 se utilizaron concentraciones de 15, 20 y 30% como fuente de azúcares en el proceso fermentativo. Además, la bebida fue elaborada tanto con té verde como con té negro. Las bebidas con té y mucílago elaboradas fueron analizadas en base a los parámetros físico-químicos pH, acidez, sólidos solubles totales, absorbancia, transmitancia, sólidos en suspensión, densidad, turbidez, y grado alcohólico. Además, se evaluó la población de microorganismos aerobios mesófilos totales y levaduras, y los parámetros sensoriales de apariencia, color, aroma y sabor. El tipo de té afectó a todos los parámetros físico-químicos excepto los sólidos en suspensión. De tal manera que la kombucha con té verde fue más ácida, con menos °Brix, más turbia y densa y con menor grado alcohólico que la kombucha elaborada con té negro, aunque en general las diferencias no fueron acusadas. El porcentaje de mucílago influyó en todos los parámetros físico-químicos excepto la absorbancia, sólidos en suspensión y turbidez. A mayor contenido en mucílago de cacao CCN-51 la kombucha presentó mayor acidez y °Brix, más denso y con más alcohol. Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos se situaron por encima de 5 log ufc/mL, aunque no se observaron diferencias significativas. Finalmente, respecto a los parámetros sensoriales, se puede decir que las kombuchas elaboradas con mucílago de cacao fueron altamente aceptadas con puntuaciones superiores a 6 en todos los atributos elaborados. El mejor aroma se encontró con 20% de mucílago de cacao, presentando diferencias significativas con las otras concentraciones.

Otro de las aplicaciones desarrolladas en esta tesis doctoral fue la aplicación de mucílago de cacao en la elaboración de cerveza artesanal tipo Ale. La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más populares del mundo y su elaboración es un proceso que ha evolucionado a lo largo de la historia, incorporando nuevos ingredientes y técnicas. En esta investigación se aborda la elaboración de cerveza con la adición de mucílago de cacao de dos variedades (Fino de Aroma y CCN-51) a concentraciones de 20 y 30%, además de evaluar dos tipos de lúpulo: Cascade y Northern Brewer. A las cervezas artesanales elaboradas se le evaluó el pH, acidez, sólidos solubles totales, sólidos en suspensión, densidad, espuma, grado alcohólico, amargor, absorbancia, transmitancia, turbidez y parámetros ópticos ( $L^*$ ,  $a^*$ , y  $b^*$ ). La variedad de mucílago influyó en el pH, acidez, °Brix, densidad, espuma, amargor, y parámetros ópticos de tal manera que las cervezas elaboradas con mucílago Fino de Aroma presentaron menor acidez y contenido en sólidos solubles, fue menos densa, con más espuma, más amarga y con un color dorado más claro. La inclusión de mucílago de cacao provocó el aumento de los grados alcohólicos al doble de la cerveza control. El aumento de mucílago en las formulaciones incrementó de forma significativa la espuma, los grados alcohólicos y el amargor. El lúpulo Northern Brewer incrementó los sólidos solubles en suspensión, el amargor y la luminosidad de la cerveza. Todos los resultados obtenidos en el presente estudio se encontraron dentro de los parámetros establecidos por la norma ecuatoriana INEN2262 (2013). Finalmente, se pudo observar la alta aceptación de las cervezas elaboradas con mucílago de cacao en los parámetros sensoriales de apariencia, aroma, sabor y sensación en boca.

En el último objetivo específico desarrollado en esta tesis doctoral se evaluó el uso del mucílago del cacao para la conservación de diversos tipos de carnes. En este sentido, la microbiología desarrollada de forma espontánea del mucílago del cacao en el que dominan, además de las levaduras, las bacterias ácido-lácticas, posibilita su uso para el control de los microorganismos que se desarrollan durante la conservación de la carne, bien por la acción directa de las bacterias o bien por sus metabolitos antimicrobianos entre los que destacan los ácidos orgánicos, en particular el ácido láctico, y las bacteriocinas. Para este trabajo se estudió

el efecto de los mucílagos de las variedades de cacao Fino de Aroma y CCN-51 sobre carnes de cerdo, pollo y ternera durante 7 días de almacenamiento a 4°C. Se evaluaron los parámetros de pH, % de acidez, humedad, capacidad de retención de agua, dureza, luminosidad (L\*), color rojo (a\*) y color amarillo (b\*). La aplicación de mucílago afectó a todos los parámetros anteriormente señalados, destacando que las carnes tratadas con mucílago fueron más ácidas, con más humedad y capacidad de retención de agua, menor dureza y más luminosas que las carnes sin tratar. No se observaron diferencias relevantes entre la aplicación de los diferentes tipos de mucílagos. Finalmente, en los aspectos microbiológicos, la aplicación de mucílago de cacao redujo los recuentos de *Escherichia coli* y levaduras en torno a 2 unidades logarítmicas. Por todo ello, el mucílago de cacao puede ser una alternativa viable para la conservación de la carne fresca.

De esta manera, los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la conveniencia de considerar el mucílago del cacao como un subproducto con amplias opciones para su revalorización asociadas a su composición y propiedades funcionales. En el contexto de la producción de cacao en Ecuador, el aprovechamiento del mucílago del cacao para los fines propuestos en los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral contribuiría, por un lado, a aliviar los problemas ambientales que genera la gestión del mucílago del cacao y, por el otro, a generar nuevas oportunidades de negocio que mejoren la calidad de vida y la economía de las regiones productoras de cacao.

## **II. INTRODUCCIÓN**

## **II.1. ECUADOR: SITUACIÓN GEOGRÁFICA, RECURSOS NATURALES Y CONTEXTO SOCIOECONÓMICO**

Ecuador es considerado como uno de los 12 países megadiversos del mundo en términos de diversidad biológica, con ecosistemas y culturas vivas representadas en sus nacionalidades y 18 pueblos con costumbres, idiomas y tradiciones múltiples posee también el 11% de la biodiversidad del mundo en un territorio de tan sólo 283.520 km<sup>2</sup> con una gran diversidad climática, étnica y cultural (Castillo et al., 2018).

Al respecto, la economía ecuatoriana sigue dependiendo de los ingresos percibidos por los productos del sector primario; es decir, no conllevan un valor agregado considerable. En otras palabras, la estructura productiva no ha tenido un cambio que permita darle una mejora en los niveles de competitividad para así responder de forma positiva a las exigencias que dictan los mercados internacionales. Las características naturales de Ecuador, principalmente debidas a que es el país con mayor contenido en agua dulce y por su ubicación geográfica, goza de una gran riqueza natural y entre sus recursos naturales más destacados están el banano, el cacao, las frutas tropicales, las especies marinas, el petróleo y los tubérculos (Orellana & Laivay, 2018). Estas características y recursos definen las actividades productivas del Ecuador, y son diversas las formas como lo hacen, al igual que son diversas las maneras de entender como tales formas afectan la situación social. Las actividades que están directamente relacionadas con la explotación de recursos naturales muestran un peso constante dentro de la estructura porcentual del Producto Interno Bruto (PIB), que de forma más o menos estable se encuentra estructurado de la siguiente manera: agricultura 8,6%; pesca 1,8%; minas y canteras 21,3%; manufacturas 13,9%; productos alimenticios 7,7%; textiles y cuero 2,0%; producción y manufactura maderera 1,3%; papel 0,5%; químicos y caucho 1,0% (Geoecuador, 2008). El sector agropecuario en el país es de vital importancia debido a su aporte al PIB. De acuerdo con datos oficiales del Banco Central durante el año 2019 (INEC, 2021b), el aporte del sector fue del 7,7%. Hablando del empleo, el mayor porcentaje de personas ocupadas (29,4%) se encuentran laborando en actividades agropecuarias. Además, desempeña un papel estratégico dentro del concepto global de seguridad alimentaria, ya que contribuye al menos con la quinta parte de la producción de bienes y servicios del país (*Boletín Técnico "Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2020,"* 2021).

En Ecuador, la superficie de cultivos fue de 5,2 millones de hectáreas. Para agregar esta categoría es necesario sumar los valores de las superficies de cultivos permanentes, transitorios, pastos cultivados y naturales (INEC, 2021a). En la Figura II.1. se muestra que la superficie de cultivos permanentes en 2021 fue de 1.498.668 hectáreas, en los que se incluyen el plátano, el banano, la caña de azúcar, la palma africana y el cacao. El cacao, representa el 41,83 % de la superficie total plantada, siendo el principal cultivo del país (INEC, 2022).



**Figura II.1.** Superficie de los cultivos permanentes en Ecuador correspondiente al año 2021.

### II.1.1. Productividad agrícola y pobreza rural

Es importante resaltar que en Ecuador el 40% de la población vive en áreas rurales, de los cuales el 60% son pobres. Los pobres rurales tienden a estar concentrados en el sector agrícola, tienen limitado acceso a la tierra y trabajan la tierra poco productiva. Consecuentemente, su ingreso está atado a la producción agrícola y forestal, de modo que las políticas para incrementar la productividad agrícola y el acceso a la tierra prometen ser herramientas efectivas para reducir la pobreza rural y probablemente la degradación ambiental (Geoecuador, 2008; León, 2016). La producción agrícola, el uso de insumos y la eficiencia varían con respecto del tamaño de la propiedad, y así también los retornos a los diferentes tipos de insumos. Las áreas pequeñas (de 0 a 1 ha) son generalmente más productivas que las propiedades grandes (de más de 10 has).

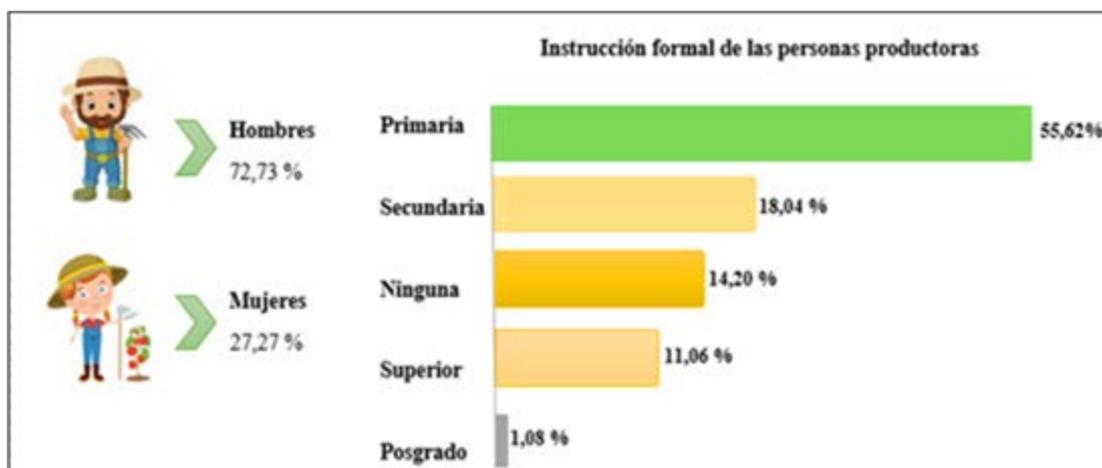
El acceso al crédito representa el aliciente más importante para el aumento de productividad en la agricultura de pequeña escala, donde los pobres rurales están concentrados. La educación técnica agrícola y el acceso a fertilizantes y pesticidas inciden también en la productividad, aunque estos últimos pueden tener consecuencias ambientales negativas que deben ser tomadas en cuenta (Geoecuador, 2008).

La correlación entre la productividad agrícola y el ingreso es más débil entre los trabajadores agrícolas en comparación a los que se autoemplean, lo que sugiere que el acceso a la tierra juega un rol clave en la determinación de la distribución de los beneficios asociados con mejoras en la productividad agrícola.

Las personas que laboran en la producción en el sector agrícola en el país pertenecen en su mayor parte al grupo de adultos, existe poco interés por parte de los jóvenes en incursionar en este sector. Es necesario mencionar que la instrucción formal de aquellas personas que se dedican a este sector en su gran mayoría solo posee un nivel de escolaridad primaria, situación que se ve acentuada por el hecho de que en el sector rural el 90% de los niños no acceden a la educación secundaria (Armijos, 2021).

Del total de productores investigados en 2021, el 55,62 % han manifestado haber terminado la primaria; mientras que el 14,20 % indican no tener ningún tipo de instrucción formal. Sólo un 11,06% indicaron haber finalizado estudios superiores (Figura II.2). En este

contexto se hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas de negocio, basadas en la economía circular, que contribuyan al desarrollo socioeconómico de estas regiones.



**Figura II.2.** Instrucción formal de las personas productoras en Ecuador. **Fuente:** (INEC, 2020)

## II.2. INDUSTRIA ALIMENTARIA

### II.2.1. LA SOBERANÍA ALIMENTARIA

La soberanía alimentaria se entiende como el derecho de los pueblos a definir sus propias políticas y estrategias sustentables de producción, distribución y consumo de alimentos, sobre los intereses del comercio. Este concepto fue introducido por el movimiento social de la Vía Campesina en la Cumbre contra el hambre de la FAO en 1996. Se trata de la proclamación del derecho de los pueblos, de los países y regiones a definir sus propias políticas agropecuarias y de producción de alimentos. Se ha visto fortalecido con la lucha de las organizaciones campesinas por mantener el control del proceso de producción de alimentos y de los factores de producción, incluyendo las semillas (Álvarez et al., 2012).

El sistema alimentario mundial está provocando una degradación ambiental a gran escala y es uno de los principales contribuyentes al cambio climático. Su baja diversidad y la falta de producción de suficientes frutas y verduras está contribuyendo a una crisis sanitaria mundial. La extraordinaria diversidad de especies de árboles tropicales se reconoce cada vez más como vital para la salud del planeta y especialmente importante para apoyar la mitigación del cambio climático. Sin embargo, están mal integrados en los sistemas alimentarios (Jansen et al., 2020).

### II.2.2. SEGURIDAD ALIMENTARIA

Seguridad Alimentaria según la FAO y las políticas nacionales la definen como: “Seguridad alimentaria nutricional es el acceso físico, económico y socio cultural de todas las personas en todo momento a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos, de manera que puedan ser utilizados adecuadamente para satisfacer sus necesidades nutricionales, a fin de llevar una vida activa y sana” (Rodríguez, 2019).

### II.2.2.1. Componentes de la seguridad alimentaria

**1. Componente Disponibilidad:** A nivel local o nacional tiene en cuenta la producción, las importaciones, el almacenamiento y la ayuda alimentaria. Para sus estimaciones se han de tener en cuenta las pérdidas postcosecha y las exportaciones de alimentos (FAO, 2019).

**2. Componente Acceso:** El acceso a los alimentos puede ser físico y/o económico. La falta de acceso físico se da cuando los alimentos no están disponibles en cantidad suficiente allí donde se necesita consumirlos. El aislamiento de las poblaciones y la falta de infraestructuras pueden incidir en la imposibilidad de contar con alimentos en condiciones adecuadas de manera permanente o transitoria. A menudo, el acceso se analiza desde una perspectiva de ausencia de renta de las personas para alimentarse con regularidad, calidad y dignidad, debido a la imposibilidad de pagar los precios de los alimentos dado el bajo poder adquisitivo de la población (FAO, 2019).

**3. Componente Consumo:** Se refiere a que las existencias alimentarias en los hogares respondan a las necesidades nutricionales, a la diversidad, la cultura y las preferencias alimentarias. También tiene en cuenta aspectos como la inocuidad, la dignidad, las condiciones higiénicas de los hogares y la distribución con equidad dentro del hogar (FAO, 2019).

**4. Componente Utilización Biológica:** Está relacionada con el estado nutricional, como resultado del uso individual de los alimentos (ingestión, absorción y utilización) y el estado de salud. A continuación, se definen los términos más habituales relativos a la nutrición en el marco de la seguridad alimentaria:

- **Subnutrición:** Inseguridad alimentaria crónica, en que la ingestión de alimentos no cubre las necesidades energéticas básicas de forma continua.
- **Malnutrición:** Estado patológico resultante por lo general de la insuficiencia o el exceso de uno o varios nutrientes o de una mala asimilación de los alimentos.
- **Desnutrición:** Estado patológico resultante de una dieta deficiente en uno o varios nutrientes esenciales o de una mala asimilación de los alimentos. Entre los síntomas se encuentran: retraso del crecimiento, insuficiencia ponderal, capacidad de aprendizaje reducida, salud delicada y baja productividad (FAO, 2019).

**5. Componente Estabilidad:** Se refiere a solventar las condiciones de inseguridad alimentaria transitoria de carácter cíclico o estacional, a menudo asociadas a las campañas agrícolas, tanto por la falta de producción del alimento en momentos determinados del año, como por el acceso a recursos de las poblaciones asalariadas dependientes de ciertos cultivos. En este componente juega un importante papel la existencia y disponibilidad de infraestructura de almacenamiento a nivel nacional y/o local en condiciones adecuadas, así como la posibilidad de contar con recursos alimenticios e insumos de contingencia para las épocas de déficit alimentario (FAO, 2019).

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad está aumentando rápidamente entre los niños latinoamericanos, lo que plantea desafíos para los sistemas de salud actuales y aumenta el riesgo de una amplia gama de enfermedades. En toda la región, los niños enfrentan una doble

carga de desnutrición y exceso de peso. Si bien los esfuerzos para abordar la desnutrición han logrado mejoras notables, la obesidad infantil está en aumento como resultado de dietas que favorecen alimentos ricos en energía y pobres en nutrientes y la adopción de un estilo de vida sedentario (Corvalán et al., 2017).

### **II.2.2.2. La inseguridad alimentaria**

La inseguridad alimentaria en los países subdesarrollados se debe a la incapacidad de los hogares en adquirir los alimentos debido al bajo poder adquisitivo. Los problemas alimenticios que generan la inseguridad alimentaria en Ecuador no se originan por la escasa disponibilidad de los alimentos, estos se generan por el pobre acceso económico de los hogares a los alimentos para un régimen de alimentación que satisfaga las demandas nutricionales (Eche, 2018).

Las personas que experimentan una inseguridad alimentaria moderada afrontan incertidumbres sobre su capacidad para obtener alimentos y se han visto obligadas a reducir, en ocasiones durante el año, la calidad o la cantidad de alimentos que consumen debido a la falta de dinero u otros recursos. Ésta hace referencia, por tanto, a una falta de acceso continuado a los alimentos, lo cual disminuye la calidad de la dieta, altera los hábitos alimentarios normales y puede tener consecuencias negativas para la nutrición, la salud y el bienestar. En cambio, en el caso de las personas que afrontan una inseguridad alimentaria grave es probable que se hayan quedado sin alimentos, hayan experimentado hambre y, en las situaciones más extremas, hayan pasado varios días sin comer, lo cual pone su salud y bienestar en grave riesgo (FAO, 2019).

Inseguridad alimentaria grave según las últimas estimaciones del año 2018 supone el 9,2% de la población mundial (o algo más de 700 millones de personas), lo cual implica reducciones de la cantidad de alimentos consumidos hasta el punto de que estas personas pueden haber experimentado hambre. No resulta sorprendente que la cifra de 2018 y los niveles registrados durante el período comprendido entre 2014 y 2018 guarden una coherencia amplia con los relativos a la prevalencia de la subalimentación, lo cual confirma la complementariedad entre los dos indicadores a la hora de hacer un seguimiento del alcance de la privación de alimentos grave o “hambre” (FAO, 2019).

### **II.2.3. CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA DE ECUADOR**

Según datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería del 2019 la clasificación de la agroindustria alimentaria tiene mayor peso con un 68% a diferencia de las no alimentarias. Esto es debido a que el país genera gran variedad de alimentos y a su vez esta se subdivide en 133 actividades de la agroindustria que corresponden a: sin transformación, almacenamiento y con transformación (MAG, 2019). En el año 2002, en el Ecuador, expidieron el decreto del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura para Alimentos Procesados en las empresas, con el objetivo de que obtengan el Registro Sanitario de sus productos alimenticios.

El sector de la industria alimentaria es ese gigante invisible o poco valorado, necesario para la supervivencia y desarrollo de un país y que pese a estas características, no es tomado en cuenta con la importancia que merece, es el que se encarga de cubrir una de las necesidades

básicas del ser humano como es la alimentación y que se encuentra al mismo nivel que la salud, el descanso y otras funciones vitales ( Fuentes-Pérez, 2020).

La clasificación de la agroindustria en el Ecuador está en función de los productos que interviene en los procesos productivos y su valor agregado, sin embargo, Oñate et al. (2021) propuso otra clasificación de la agroindustria ecuatoriana que, en general, incluye la alimenticia y la no alimenticia (Tabla II.1). Esta particular clasificación identifica cuatro sectores agroindustriales vinculados a la producción, transformación (procesamiento), comercialización y distribución de alimentos para el consumo en general (Oñate et al., 2021).

**Tabla II.1.** Clasificación e identificación de la agroindustria alimentaria del Ecuador.

<b>Tipo de Agroindustria</b>	<b>Condiciones de Producción</b>	<b>Productos</b>
<b>Primario Exportadora tradicional</b>	Grandes extensiones de tierra. Uso de agroquímicos. Mayor inclusión de mano de obra.	Banano, café. Cacao, caña de azúcar
<b>Agroindustria de producción de vegetales y derivados</b>	Extensiones medias y grandes de tierra Dependiendo del tipo de cultivo Mayor inclusión de la producción campesina Uso medio de mano de obra y agroquímicos.	Cereales grasas vegetales. Aceites y otros.
<b>Agroindustria de procesamiento de alimentos y bebidas</b>	Mayor nivel de tecnología. Mano de obra especializada. Producción en cadena.	Enlatados, harinas Refrescos, jugos, otros.
<b>Agroindustria de procesamiento de lácteos y carne</b>	Grandes extensiones de tierra. Mano de obra menor en labores de pastoreo, cuidado y ordeño. Mayor inversión en tecnología.	Queso, yogurt, mantequilla, carnes, aceites y grasas animales

Fuente: (Oñate et al., 2021)

## **II.3. PRODUCTOS VEGETALES CON ESCASA REVALORIZACIÓN**

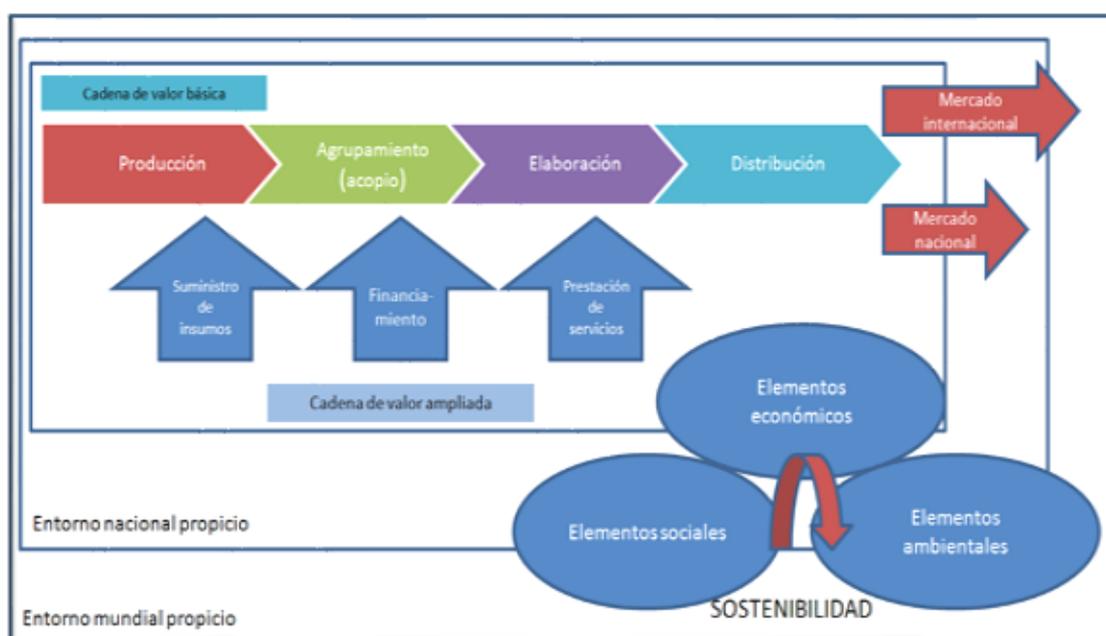
### **II.3.1. LAS CADENAS DE VALOR**

Las cadenas de valor dentro del sector agroalimentario son importantes puesto que permiten a las empresas tomar decisiones para reducir el riesgo e incrementar los beneficios. Esto a su vez permite realizar un trabajo de planificación y contribución de información, mercadeo y estructura de costos (mano de obra, maquinaria, materia prima, insumos, entre otros), que se comparten para obtener la mayor ganancia y la competitividad de la cadena (Durán, 2020).

La implementación de la cadena de valor en los agronegocios se convierte en un instrumento efectivo para combatir la desigualdad entre productores, al favorecer mayores ingresos de los productores y una apropiación más equilibrada del valor agregado, por lo que una correcta implementación de las políticas públicas tienen un papel central en estos procesos,

por ende el gobierno nacional y los gobiernos locales juegan un papel primordial en el desarrollo de las cadenas de valor como herramienta administrativa eficiente (Poma, 2022).

La producción y el consumo de alimentos y por ende su comercio internacional se enfrentan a una creciente demanda en términos de volumen y calidad. Su vínculo con el desarrollo sostenible, la pobreza, la nutrición y los impactos ambientales mantiene al sector en el centro de numerosas políticas nacionales y mundiales (Figura II.4). En ese contexto, la cadena de valor alimentaria (que incluye actores en distintos países) está incorporando nuevas prácticas que pretenden integrar todas estas dimensiones. A la inocuidad se han sumado una serie de atributos relacionados con el cultivo, procesamiento y comercialización de los alimentos, en un esquema de corresponsabilidad (Olmos, 2017).



**Figura II.4.** Marco conceptual de las cadenas de valor alimentarias sostenibles. **Fuente:** (Olmos, 2017).

### II.3.2. VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS

Las empresas de procesamiento de alimentos están controladas por influencias sociales e intereses económicos, pero sus esfuerzos con respecto a la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos son muy diferentes. Las empresas de procesamiento de alimentos son responsables de hasta 18 por ciento del desperdicio total de alimentos en países de Europa. Entre el 10 y el 55 % de la pérdida de alimentos y los residuos pueden clasificarse como evitables durante el procesamiento, ya que las empresas producen diferentes cantidades de desperdicio de alimentos por diferentes razones. La pérdida y el desperdicio de alimentos emergentes están basados en decisiones comerciales, gestión ineficiente, garantía de calidad o en general manipulación de alimentos (almacenamiento y preparación). La generación de pérdida y desperdicio de alimentos depende de la tecnología que se utilice y de la naturaleza del alimento mismo (Rösler et al., 2021). Además, la agroindustria en general produce grandes cantidades de subproductos y residuos en las diferentes etapas de los procesos productivos que actualmente supone una problemática a nivel mundial, debido a que en la mayoría de los casos no son procesados o dispuestos adecuadamente, situación que contribuye al proceso de

contaminación ambiental. El impacto de estos residuos se puede disminuir en el medio ambiente y no afectar a las comunidades aledañas. La clave es una buena gestión de los residuos que el proceso genera, lo cual permite aprovechar los nutrientes que estos residuos poseen para otros cultivos o para la producción de otros productos como energía, biocombustible, alcoholes, etc. (García et al., 2022).

En todo el mundo, los enfoques inspirados en el modelo de Economía Circular han ido en constante aumento, generando nuevas oportunidades de negocio, como la recuperación de moléculas de alto valor añadido como, por ejemplo, los pigmentos, los polifenoles, la fibra, etc. a partir de residuos de alimentos vegetales que pueden aplicarse como aditivos alimentarios. De hecho, el desperdicio de alimentos es un problema global que no parece estar disminuyendo, lo que genera problemas económicos, ambientales y sociales. Además, el empleo de sustancias de síntesis, como por ejemplo los tintes sintéticos se han asociado con efectos adversos en la salud humana, lo que fomenta la investigación para explorar pigmentos mucho más seguros, naturales y ecológicos (Lombardelli & Esti, 2022). Por lo tanto, la valorización de los subproductos alimentarios en el marco de una economía circular se está volviendo cada vez más crucial por razones económicas y medioambientales (Rojo et al., 2020).

En la agroindustria, las materias primas son sometidas a procesos de adecuación o transformación para darle valor agregado, mediante la implementación de operaciones unitarias para facilitar su consumo; generando una de las principales problemáticas ambientales en nuestro medio, la alta producción de residuos. En algunos casos estos residuos son tratados hasta reducir el impacto negativo que su emisión, vertimiento o disposición pudiera generar; convirtiéndolos en un producto útil y de mayor valor agregado que solucione una problemática y genere ingresos económicos adicionales (Cury et al., 2017).

La valorización de primera generación se orienta a la obtención de productos de consumo: alimento para animales, compost, sustrato para cultivos de hongos, biogás, bioetanol, biohidrógeno; mientras que la de segunda generación, busca la extracción de componentes tales como fenoles, azúcares, almidón, ceras, resinas, pectina, celulosa, colágeno, quitosano, aminoácidos, etc. para la fabricación de productos básicos y especialidades químicas, a través de procesos de conversión química y catalítica, conversión biológica y síntesis limpia. Además, la revalorización de subproductos agrícolas permite aprovechar los generados diariamente.

### **II.3.3. PRINCIPALES CULTIVOS DE ECUADOR**

Dentro de la producción agropecuaria se encuentra distribuida por provincias en función al número de hectáreas cultivadas como se detalla en la Tabla II.2. Se encuentran los principales cultivos que se siembran en las cinco provincias del Ecuador con su superficie respectiva. Los cultivos más representativos son: Banano, plátano, mango y cacao, todos ellos son cultivos de exportación. Otros cultivos son para el consumo interno como: arroz, café, caña de azúcar, palma africana, maíz duro, naranja y maracuyá reportados por el Ministerio de Agricultura y ganadería (MAG, 2021).

**Tabla II.2.** Principales cultivos por provincias de la Costa de Ecuador en hectáreas (2019).

<i>Cultivo</i>	<i>Santa Elena</i>	<i>Guayas</i>	<i>Manabí</i>	<i>Los Ríos</i>	<i>El Oro</i>	<i>Total</i>
<b>Arroz</b>		207.706	6.621	69.649	1.760	<b>285.736</b>
<b>Banano</b>	1.602	36.674	3.214	56.324	43.066	<b>140.880</b>
<b>Cacao</b>	400	36.674	114.553	133.219	11.534	<b>296.380</b>
<b>Café</b>	60		12.035		642	<b>12.677</b>
<b>Caña de Azúcar</b>	159	89.854		1.087		<b>90.941</b>
<b>Plátano</b>	772	9.648	49.658		345	<b>59.651</b>
<b>Palma Africana</b>		6.373	22.209	37.806		<b>66.388</b>
<b>Maíz duro</b>	4.467	41.364	94.203	96.320	2.257	<b>234.144</b>
<b>Naranja</b>				6.767		<b>6.767</b>
<b>Mango</b>	68	20.382				<b>20.382</b>
<b>Maracuyá</b>			<b>1.890</b>			<b>1.890</b>

**Fuente:** (Burgos, 2021)

Durante el año 2020 los cultivos agrícolas con mayor producción en Ecuador fueron: azúcar de caña (42,2%), bananos (23,1%), aceite de nuez de palma (9,4%), arroz (5,1%) y maíz (5,0%), por lo que estos 5 cultivos representaron 22.127.255 toneladas, es decir, el 84,8% del total de la producción nacional (INEC, 2020).

En cuanto a los cultivos con mayor superficie cosechada estuvieron: cacao (23,8%), maíz (15,4%), arroz (14,1%), aceite de nuez de palma (8,5%) y bananos (7,3%), con un total de 1.530.623 hectáreas, el 69,2% del total nacional, seguidos por: azúcar de caña, plátanos y otros, abacá, cáñamo de manila, café, verde y papas, patatas (INEC, 2020).

#### **II.4. CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)**

Como se ha comentado con anterioridad, Ecuador gracias a su riqueza en recursos biológicos y sus condiciones geográficas brinda unas condiciones climáticas adecuadas para el cultivo del cacao. Durante el siglo XX el orden socioeconómico ecuatoriano se desarrollaba en gran medida alrededor del mercado internacional del cacao (*Theobroma cacao L.*). Hoy en día, el Ecuador posee un importante predominio en este producto. Más del 70% de la producción mundial de cacao Fino de aroma se origina en el país, convirtiéndolo en el mayor productor de este tipo de cacao en el mundo. Del total de la exportación ecuatoriana se estima que un 75% es de la variedad de cacao Fino de aroma; mientras que el restante 25% pertenece a otras variedades consideradas cacao corriente, dentro de este grupo se encuentra el clon CCN-51 (INEC, 2021b). En 2021, la superficie plantada de cacao a nivel nacional fue de 626.962 hectáreas. En Ecuador, la producción de cacao se concentra un 80% en las provincias de Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, El Oro y Santa Elena, mientras que el resto se distribuye en las provincias de la Amazonia. En la Tabla II.3 se puede observar la superficie cultivada de cada a nivel nacional durante los años 2019, 2020 y 2021.

**Tabla II.3.** Superficie plantada de cacao a nivel nacional.

Año	Superficie (Has.)		Producción (Tm)	Ventas (Tm)
	Plantada	Cosechada		
2019	601.954	525.435	283.680	375.798
2020	590.579	527.347	327.903	327.415
2021	<b>626.962</b>	<b>543.547</b>	<b>302.094</b>	<b>301.807</b>

**Fuente:** (INEC, 2021b)

A nivel nacional hay una distinción clara de dos grupos: los pequeños productores, con menos de 10 ha con sistemas de producción limitados, con plantaciones asociadas a otros cultivos y árboles y el grupo de los medianos y grandes productores cuyas plantaciones en su mayoría son de monocultivos (Poma, 2022).

Los granos de cacao son las semillas crudas fermentadas o sin fermentar del árbol de cacao. Este árbol, procedente de la zona septentrional de América del Sur y actualmente difundido por todo el cinturón tropical, requiere un clima húmedo y cálido, con temperaturas anuales medias de 24-28°C, prospera en alturas hasta de 600 m y se cultiva frecuentemente junto a plantas umbrosas (Antiasarán, 2000). El fruto se considera botánicamente como una baya, tiene forma y mide de 15 a 25 cm de largo por 7-10 cm de grosor. En su interior contiene, insertos en una pulpa viscosa, entre 25 y 50 granos ovales aplanados, de unos 2 cm de longitud y 1 cm de anchura. Un árbol de cacao en la cumbre de su productividad proporciona entre 0,5 y 2 kg de granos por año. Para el aroma del cacao y para los productos fabricados con él, es importante que los frutos se recolecten bien maduros, sin llegar a la maduración excesiva (Quicazán et al., 2017). En cuanto a su composición nutricional, se puede observar en la Tabla II.4, que es un producto calórico, con alto contenido en hidratos de carbono y grasas.

**Tabla II.4.** Nutrientes del cacao por 100 g de porción comestible, extraído del archivo canadiense de nutrientes (CNF, consultado en 2023).

Nombre del nutriente	Unidad	Valor por 100 g de porción comestible
<b>Humedad</b>	g	3,00
<b>Ceniza</b>	g	5,80
<b>Proteína</b>	g	19,60
<b>Grasa total</b>	g	13,70
<b>Carbohidratos</b>	g	57,90
<b>Energía (kcal)</b>	kCal	228
<b>Fibra, dieta total</b>	g	37,0
<b>Azúcares, total</b>	g	1,75
<b>Calcio, Ca</b>	mg	128
<b>Hierro, Fe</b>	mg	13,86
<b>Magnesio, Mg</b>	mg	499
<b>Fósforo, P</b>	mg	734
<b>Potasio, K</b>	mg	1524
<b>Sodio, Na</b>	mg	21
<b>Zinc, Zn</b>	mg	6,81
<b>Cobre, Cu</b>	mg	3,788
<b>Manganeso, Mn</b>	mg	3,837
<b>Selenio, Se</b>	µg	14,3
<b>Folacina, total</b>	µg	32
<b>Folato natural</b>	µg	32
<b>Niacina</b>	mg	2,185
<b>Ácido pantoténico</b>	mg	0,254
<b>Riboflavina</b>	mg	0,241
<b>Tiamina</b>	mg	0,078
<b>Vitamina B-6</b>	mg	0,118
<b>Colina, total</b>	mg	12.0
<b>Vitamina k</b>	µg	2,5
<b>Tocoferol, alfa</b>	mg	0,10
<b>Ácidos grasos, saturados, totales</b>	g	8,070
<b>14:0</b>	g	0,020
<b>16:0</b>	g	3,690
<b>18:0</b>	g	4,250
<b>Ácidos grasos, monoinsaturados, totales</b>	g	4,570
<b>18:1</b>	g	4.570
<b>Ácidos grasos, poliinsaturados, totales</b>	g	0,440
<b>Cafeína</b>	mg	230
<b>Teobromina</b>	mg	2057
<b>Luteína y zeaxantina</b>	µg	38

**Fuente:** (CNF, 2023; Food code : 4223, 2015).

## **II.4.1. VARIEDADES DE CACAO CULTIVADAS EN ECUADOR**

En Ecuador se cultivan diferentes tipos, cultivares y variedades de cacao, predominando el clon de cacao CCN-51 (Colección de Castro Naranjal) y el cacao de tipo Nacional X Trinitario, también conocido como "Fino de Aroma" o "Arriba" (Díaz & De Vuyst, 2022). Ecuador por su posición geográfica está ubicado en la franja tropical, que lo expone a cambios ambientales y riesgo fitosanitario para cultivos aún mayores es así que es de vital importancia desarrollar un sistema de trazabilidad para este producto de exportación para cumplir con las características de calidad e inocuidad a nivel nacional e internacional (Freire, 2018), el cacao Fino de Aroma, es un producto muy valorado en el mundo, por su sabor suave y aromático (Guzmán, 2020; Sotomayor et al., 2017).

El cacao nacional es también conocido como Fino de Aroma, debido a que tiene una fermentación rápida, que le otorga al chocolate un sabor y aroma muy agradable, dicho cacao por su sabor resaltante, tiene la denominación de cacao "sabor arriba", lo que repercute en una mayor proporción de exportación y consumo, sin embargo sus semillas tienden a ser más pequeñas que los clones (CCN-51), su producción también es mucho más reducida, por ende su costo de producción es más elevado, en comparación con otras variedades (Freire, 2018). El fruto de cacao Fino de Aroma es de color amarillo intenso, ovoide con superficie rugosa y también los hay cuyos frutos son de color rojo, y aunque los subproductos de su procesamiento representan un problema de disposición importante para la industria, también son fuentes prometedoras de compuestos que pueden ser utilizados debido a su propiedades favorables tecnológica o nutricional (Murillo et al., 2020).

Existe un híbrido denominado CCN-51, también conocido como ramilla, en comparación con el cacao Fino de Aroma. Genera mayores rendimientos por hectárea y menores costos de producción (manejo), debido a su alta resistencia a plagas y enfermedades. El fruto de cacao CCN-51 es de color variable como rojo, morado, café. Este clon CCN-51 se caracteriza por su alta capacidad productiva, siendo esta cuatro veces mayor a las producciones en huertas tradicionales.

La disponibilidad de variedades genéticamente mejoradas con mayor productividad que el CCN51; es una prioridad dentro de los programas de mejoramiento genético de cacao fino de aroma de Ecuador. La obtención de variedades con mayor valor económico depende de dichos procesos de mejoramiento y de selección conducidos en centros de investigación como la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). En esta Estación Experimental, el país cuenta con un banco de germoplasma de cacao compuesto por varias colecciones vivas, además de parcelas de observación y nuevas poblaciones híbridas creadas durante las últimas décadas (Sotomayor et al., 2017).

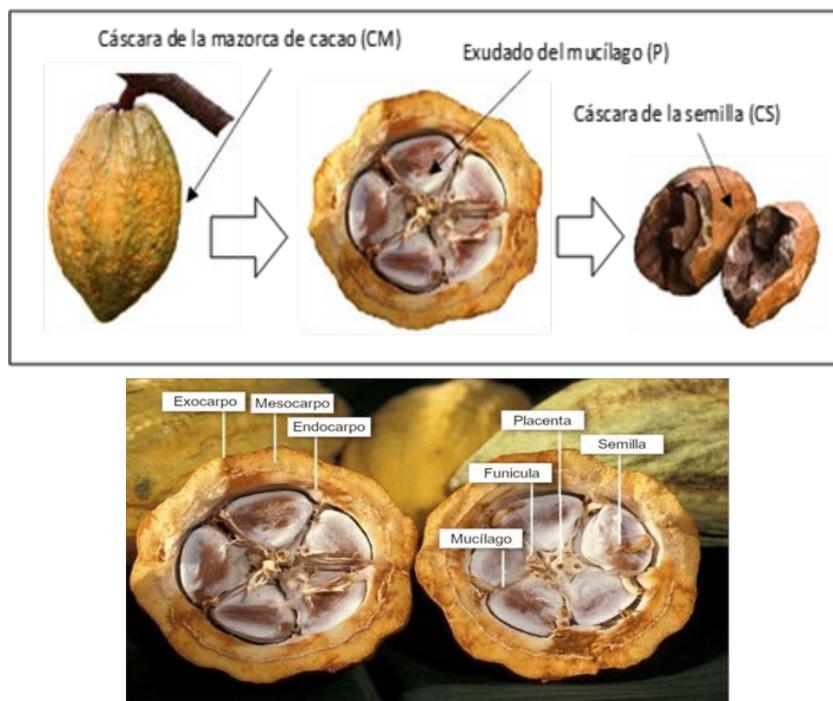
Los derivados de cacao se definen como productos que se obtienen por extracción, prensado, o pulverización, y que pueden ser tratados químicamente y mezclados o no con azúcares u otros ingredientes (NOM-186, 2020). La grasa de cacao también llamada manteca de cacao es utilizada particularmente en productos como chocolates, confitería, repostería, cosméticos y en la industria farmacéutica (Sánchez et al., 2016).

La fermentación es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más antiguas del mundo. Para los productos de cacao y café, la fermentación microbiana juega un papel

importante en sus procesos de producción y puede tener un impacto importante en la calidad y el valor del producto (Kim-Ngoc et al., 2022). El cacao y el café son los pocos productos alimenticios que quedan producidos a escala mundial donde la fermentación ocurre de manera espontánea. Si bien se han realizado importantes investigaciones con respecto a la mejora de cultivos iniciadores utilizados en el procesamiento de café y cacao, se han hecho muy pocos esfuerzos para su implementación en condiciones de campo (Melo, 2015). En general, los procesos fermentativos del cacao están dominados por levaduras de los géneros *Hanseniaspora* y *Candida*, bacterias ácido-lácticas del género *Lactobacillus*, y las bacterias ácido-acéticas del género *Acetobacter* (Lagunes et al., 2007). Se han evaluado los efectos en la calidad de la modificación en el inicio de los procesos de fermentación mediante la aplicación de una cepa de levadura *Kluyveromyces marxianus*, que aumentó el volumen de líquido drenado y afectó la estructura de la población de microorganismos durante la fermentación, lo que mejora hasta el final del proceso (Leal et al., 2008). En otro estudio, un consorcio iniciador de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* y *Acetobacter aceti* fue definido para fermentar los granos de cacao. El efecto de los consorcios de cultivos iniciadores sobre la fermentación y la calidad del cacao es significativo por lo que se podría adaptar el proceso de factibilidad tecno económica con inóculos precisos (Saunshi et al., 2020).

#### **II.4.2. SUBPRODUCTOS DEL CACAO. EXTRACCIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO**

Las moliendas mundiales de cacao en grano aumentaron levemente en casi 1% durante la campaña 2019/20, elevándose así de 4 631 miles de toneladas a 4 669 miles de toneladas. A nivel regional, se han incrementado en casi 1% las proyecciones para Europa (de 1 647 miles de toneladas a 1 671 miles de toneladas), las Américas (de 872 miles toneladas a 880 miles toneladas) y Asia y Oceanía (de 1 105 miles de toneladas a 1 116 miles de toneladas) (Romero, 2020). La mazorca de cacao está constituida por la cáscara o vaina de la mazorca de cacao (CM), exudado del mucílago (P) y cáscara de la semilla (CS) (Figura II.5), equivalentes alrededor del 70-80% del fruto total en peso seco. Dentro de los componentes de la mazorca de cacao contiene placenta que envuelve a las almendras, la cocota que es la parte fibrosa que sirve como protección de las semillas y el mucílago es la parte líquida que controla el desarrollo de las semillas.



**Figura II.5.** Componentes de la mazorca de cacao.

Como se ha comentado anteriormente, la producción de cacao conlleva la generación de un gran número de residuos y subproductos. Como se muestra en la tabla II.5, las diferentes partes de la mazorca del cacao han sido empleadas para diferentes fines.

**Tabla II.5.** Resumen de los subproductos del cacao.

<i>Aplicaciones</i>	<i>Producto</i>	<i>Componente del cacao</i>	<i>Referencia bibliográfica</i>
<i>Biocombustibles</i>	Producción bioquímica de hidrógeno (BHP)	mucílago de cacao	Rangel et al. (2021).
	Biogás	mucílago de cacao vainas de la mazorca del cacao	Rojas et al. (2020); Delgado-Noboia et al. (2021); Romero et al. (2018); Koido et al. (2018); Dahunsi et al. (2019a); (2019b); Suhartini et al. (2021); Muharja et al. (2023).
	Biocombustible	mucílago de cacao	Carvajal et al. (2018); Igbinalador & Onilude, (2013); Hernández-Mendoza et al. (2021)
<i>Biodetoxicación</i>	Tratamiento de aguas residuales	mucílago de cacao	Andrade, (2021).
	Bioadsorbente	mazorca del cacao	Eletta et al. (2020); López et al. (2022); Tejeda-Tovar et al. (2022)
<i>Usos cosméticos</i>	Tintes	mazorca del cacao	Fioresi et al. (2017); Švarc-Gajić et al. (2023); Karim et al. (2016); Gyedu-Akoto et al. (2015); Gabbay et al. (2017).
<i>Componentes</i>	Polifenoles	mucílago de cacao	Gabbay et al. (2019); Valadez-

<i>Aplicaciones</i>	<i>Producto</i>	<i>Componente del cacao</i>	<i>Referencia bibliográfica</i>
<i>bioactivos</i>	Producción de celulosa	mucílago de cacao	Carmona et al. (2017). Saavedra et al. (2021).
	Antioxidantes	La cáscara del grano de cacao	Llerena et al. (2023); Aranaz et al. (2019)
	Proteínas	mazorca de cacao	Rojo-Ventura et al. (2020); Bonvehi & Coll, (1999); Awang et al. (2010); Okiyama et al. (2019); Bonvehi & Coll, (1999); Chung et al. (2003).
	Fibra y pectinas	vaina y las cáscaras de las semillas	Martínez et al. (2012); Rojo-Poveda et al. (2020); Lecumberri et al. (2007); Nsor-Atiana et al. (2012); Chan & Choo, (2013); Jarrín-Chacón et al. (2023); Vriesmann et al. (2012); Adi-Dako et al. (2018); Samuel (2006).
	Metilxantinas	Semillas y cáscara de cacao	Heck & De Mejía, (2007); Sansone et al. (2017).
<i>Recubrimientos comestibles</i>	Barreras bioactivas	mucílago de cacao	(Solano et al., 2018).
	Actividad antimicrobiana	mucílago de cacao	(Moreno et al., 2021) (Medina-Jaramillo et al., 2020) (Nazir & Sayuti, 2018) (Azmin & Nor, 2020) (Hutomo et al., 2012).
	Bioconservante	mucílago de cacao	Morante-Carriel et al. (2023); Meersman et al. (2013); Papalexandretou et al. (2011); Munekata et al. (2020).
<i>Producción de microorganismos</i>	Biopesticida	mucílago de cacao	Achi et al. (2020); Akpo et al. (2020)
	Fertilizantes convencionales	mucílago de cacao	Aboyeji et al. (2016); Ayeni et al. (2008); Santana et al. (2018)
<i>Alimentación animal</i>	Mezclas alimenticias	Mazorca y mucílago de cacao	Laconi & Jayagenara (2015); Silva et al. (2005).
		mazorca de cacao	Esong et al. (2015); Sobamiwa et al. (1994)
<i>Nuevos alimentos</i>	La miel de cacao	mucílago de cacao	Guirlanda et al. (2021); Afolabi et al. (2015); Klis et al. (2023)
	Emulsificantes y retenedores de humedad	vaina de cacao	Delgado-Ospina et al. (2021); Flor et al. (2023)
	Edulcorantes	mucílago de cacao	Moreira-Macías et al. (2023); Guirlanda et al. (2021); Firdaus et al. (2022).
	Bebidas fermentadas tipo vino	mucílago de cacao	Tinh et al. (2016); Yuliana et al. (2023); Klis et al. (2023)
	Panificación	vaina de cacao	Amir et al. (2013); Martínez-Cervera et al. (2011)

La vaina de la mazorca del cacao es el principal subproducto del cacao, suponiendo entre el 67 y 76% del peso total del fruto (Campos-Vega et al., 2018). Dicho de otra manera, se generan 10 toneladas de vaina de mazorca de cacao por cada tonelada de semillas. La vaina de la mazorca es generalmente desechada por los agricultores tras su separación de las semillas del cacao, constituyendo un serio problema de generación de residuos a la vez que se desaprovecha un recurso con gran potencial para su revalorización (Makinde et al., 2019; Vriesmann et al., 2011). La composición de este subproducto se basa en proteínas (5,9-9,1%), carbohidratos (46,6%), fibra (22,6-35,7%), grasa (1,2-10%) y minerales entre otros (Makinde et al., 2019; Oddoye et al., 2013).

En cuanto a las cáscaras de las semillas de cacao (CS), es uno de los principales subproductos de la transformación del cacao, que representan del 10% al 17% del peso total del grano de cacao. Los datos acerca de su composición son altamente variables, aunque se pueden señalar como rangos de valores 7,8-70,2% de carbohidratos, 10,3-27,4% de proteínas, 17,4-66,3% de fibra y 1,5-8,4% de grasa (Makinde et al., 2019; Rojo-Poveda et al., 2020). Además, presenta compuestos volátiles del cacao, minerales, vitaminas y un gran espectro de polifenoles y metilxantinas.

Finalmente, el subproducto objeto de esta tesis doctoral, el mucílago del cacao, también llamado exudado, “agua de cacao” o “miel de cacao”, ha sido generalmente considerado un desecho porque su almacenamiento es delicado a temperatura ambiente. Presenta una composición rica en carbohidratos (68 g/100 g de materia seca), cenizas (7,5 g/ 100 g de materia seca), proteínas (5,5 g/100 g de materia seca) y grasas (2 g/100 g de materia seca), aunque existen diferencias marcadas en función de la variedad de cacao como demostraron Chang et al. (2023) al comparar el exudado de las variedades Fino de Aroma, CCN-51 y IMC-67. La fibra dietética total supone alrededor de 17 g/100 g de materia seca (Anvoh & Gnakri, 2009; Neto et al., 2016; Santos et al., 2014; Silva et al., 2014). Además, presenta un interesante contenido en compuestos con actividad biológica como el contenido en compuestos fenólicos, con valores superiores a 100 mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra, y actividades antioxidantes mediante los métodos ABTS, DPPH y ORAC de alrededor de 4  $\mu$ M equivalentes de trolox/g (Llerena et al., 2023; Martínez et al., 2012). Además, se caracteriza por su contenido en diferentes ácidos orgánicos como ácido cítrico (2,1–2,4 %), ácido láctico (0,03 %) y ácido acético (0,04%). Contiene también vitaminas como el ácido ascórbico y la cobalamina (Sakia et al., 2022).

La extracción del mucílago del cacao comienza tras la ruptura en el campo de las vainas, en las que las semillas son extraídas junto con la pulpa mucilaginoso (Rojo-Poveda et al., 2020). Tras la extracción de las semillas y la pulpa comienza una fermentación espontánea en el propio campo. Esta fermentación continúa en bateas, y tiene un gran impacto en el desarrollo de los precursores del aroma del cacao. La microbiología del mucílago del cacao tiene un impacto determinante en el sabor del cacao, que es la propiedad organoléptica más importante según los consumidores de chocolate. Entre los grupos microbianos, las levaduras tienen un papel esencial en la generación de los compuestos volátiles asociados a la calidad del cacao. A través de reacciones asociadas con el metabolismo de los aminoácidos, las levaduras generan importantes aromas precursores como ésteres de acetato y ésteres etílicos de ácidos grasos que son esenciales para desarrollar sabores afrutados y aromas en el producto final (Gutiérrez et al., 2022). Además, algunas levaduras pueden tener propiedades pectinolíticas y actividad antifúngica, lo cual es deseable en el proceso de poscosecha del cacao. Se han

identificado representantes de las *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia galeiformis*, *Galactomyces Geotrichum*, *Wickerhamomyces anomalus*. Además, algunos aislados de levadura específicos podrían usarse como marcadores biológicos para predecir la determinación de las características sensoriales del chocolate y para indicar el origen geográfico o la historia de procesamiento de los lotes de granos de cacao (Díaz & De Vuyst, 2022; Junior et al., 2023; Koné et al., 2016). Además de las levaduras, diversas especies de bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas han sido identificadas como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter tropicalis*, que tienen un papel esencial en la modificación del pH mediante la producción de diversos ácidos orgánicos al igual que en la generación de compuestos aromáticos (Lee et al., 2019).

Mediante las actividades enzimáticas de los microorganismos disminuye la densidad y viscosidad del mucílago tras la degradación de las pectinas. Con ello se facilita la incorporación de oxígeno y el estímulo para el desarrollo de bacterias ácido-acéticas, que continúan la fermentación (Chagas Junior et al., 2020). Debido a la licuefacción de la pulpa, este jugo es drenado durante el comienzo de la fermentación hasta finalmente la pasteurización del cacao, donde se obtiene la mayoría del jugo (Santos et al., 2014; De Vuyst & Leroy, 2020; Díaz-Muñoz et al., 2021). El drenado del líquido tradicionalmente se ha realizado con prensas de madera, aunque en la actualidad se están introduciendo las prensas de acero para evitar la contaminación microbiana (Abballe et al., 2021). En la Figura II.6 se muestra el aspecto del mucílago o exudado del cacao.



**Figura II.6.** Aspecto del mucílago, exudado, agua de cacao o miel de cacao (Guirlanda et al., 2021).

Una vez obtenido el mucílago, es necesario aplicar métodos de conservación para su posterior utilización. Esto es debido a la elevada carga microbiana presente en este líquido asociada a las diferentes etapas del proceso artesanal de producción del cacao, a los materiales inadecuados utilizados en su obtención tanto en las estructuras como en los utensilios. Si los microorganismos no se inactivan inadecuadamente, continúan los procesos microbianos produciendo cambios reológicos y sensoriales no deseables. De hecho, el principal obstáculo para su posterior utilización en la aplicación de métodos de conservación económicamente viables (Guirlanda et al., 2021).

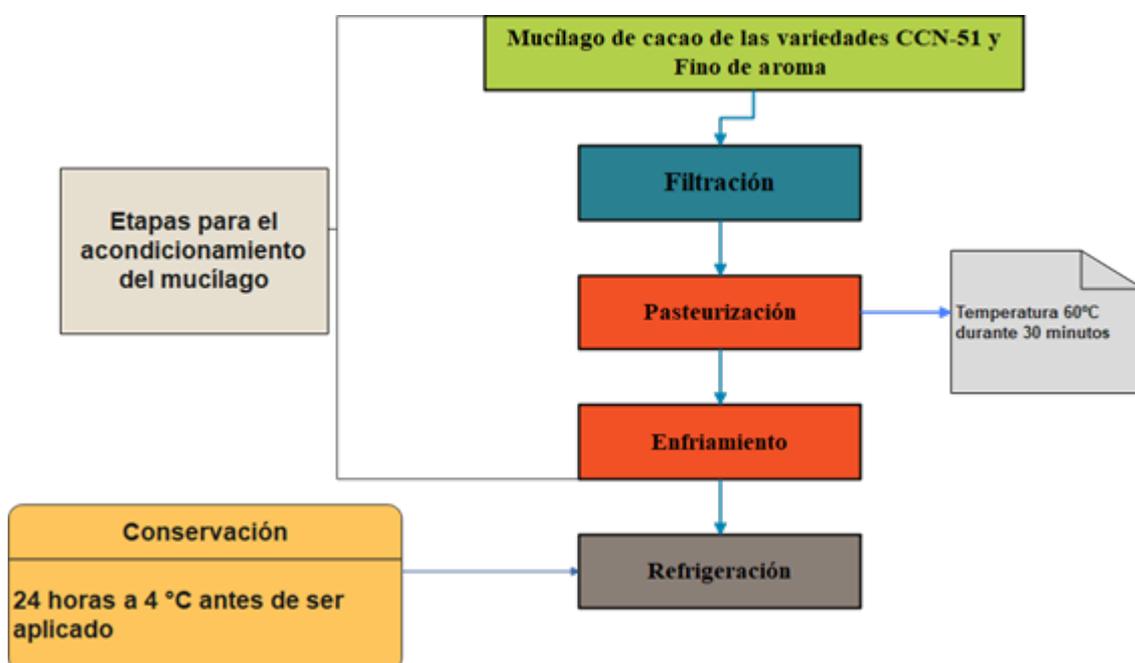
A continuación, se detallan las principales operaciones realizadas posteriormente a la extracción de mucílago de cacao (Figura II.7).

**Filtración:** En esta etapa se efectúa para eliminar materiales vegetales que quedan de la cosecha y semillas, además de piedras u otras sustancias extrañas.

**Pasteurización:** se incrementa su temperatura a 60°C durante 30 minutos para eliminar la mayor parte de los microorganismos que naturalmente colonizan el cacao y que pueden contaminar durante la posterior extracción del mucílago ya que tiene contacto con pisos, drenajes y cajas de madera en las cuales se fermenta el cacao para que adquiera mayor aroma.

**Enfriamiento:** Disminución de temperatura para llevar a la siguiente etapa que es la refrigeración.

**Refrigeración:** El mucílago es envasado en envases de cristal ya que puede activarse las levaduras presentes en el cacao y, por lo tanto, se genera el proceso fermentativo incrementando la presión interna en el envase. En esta fase el mucílago se mantiene durante 24 horas a 4°C antes de ser aplicado.



**Figura II.7.** Operaciones posteriores a la extracción de mucílago de cacao.

#### II.4.2.1. Subproductos del cacao y sus aplicaciones

A pesar de que el aprovechamiento y la revalorización de los subproductos y residuos del cacao en Ecuador está todavía muy lejos de alcanzar unos resultados razonables, existen diversas investigaciones que ponen de manifiesta la posibilidad de generar valor añadido a partir de los desechos de la producción del cacao (Lu et al., 2018; Porto et al., 2022; Vásquez et al., 2019). Para una mejor comprensión de las aplicaciones y destinos de los diferentes subproductos del cacao, se presenta la clasificación en: alimentación animal, producción de biocombustible, biodetoxificación, usos cosméticos, extracción de componente bioactivos, plastificantes y recubrimientos comestibles, y finalmente su utilización en la innovación alimentaria.

- **Fertilizantes y fitosanitarios**

Algunos trabajos han puesto de manifiesto la utilización de los subproductos del cacao como fertilizantes y fitosanitarios. El trabajo de Moreno et al. (2021) pone de manifiesto la utilidad del mucílago del cacao para tratar ciertos fitopatógenos propios del cultivo del cacao como *Moniliophthora roreri*. La actividad antifúngica se asoció a los ácidos orgánicos presentes en el mucílago derivados de su fermentación. Otros trabajos ponen de manifiesto que el elevado contenido en minerales de la vaina del cacao, particularmente potasio, calcio y fósforo, posibilitando la sustitución parcial de fertilizantes convencionales por estos subproductos (Aboyeji et al., 2016; Ayeni et al., 2008).

- **Alimentación animal**

Según Makinde et al. (2019) la totalidad de los subproductos del cacao son adecuados para la alimentación animal. Sin embargo, la revisión bibliográfica de estos autores pone de manifiesto que su adecuación para la alimentación animal depende del tipo de subproducto, y de los porcentajes de inclusión de subproductos del cacao en la dieta, pudiéndose encontrar efectos perjudiciales si la sustitución es muy elevada. Las vainas de la mazorca del cacao constituyen una buena fuente para la alimentación del ganado. Laconi & Jayagenara (2015) evaluaron diferentes tratamientos sobre este subproducto para la alimentación de novillos. Estos tratamientos incluían la adición de 1,5% de urea, 3% de molasas, 3% de contenido del rumen, e inóculos de *Phanerochaete chrysosporium*. La inclusión de cáscara de cacao y polvo de cacao puede ser una buena elección para mejorar la alimentación de cabras basado en el uso de subproductos de la industria cervecera (Aregheore, 2002). Del mismo modo, se ha observado que es viable sustituir hasta un 9% de harinas de maíz o soja con harina de cacao para la alimentación de cabras lactantes (Silva et al., 2005).

En cuanto a la alimentación de los no rumiantes, se ha podido comprobar que la sustitución del maíz hasta en un 20% con vaina de mazorca de cacao no disminuyó las ganancias de peso de conejos (Esong et al., 2015). Los resultados de la alimentación de pollos con vainas de mazorca de cacao muestran que la capa superficial de estas vainas, el epicarpio, supone la principal limitación para el uso de este subproducto debido a su elevado contenido en lignina y pectinas que disminuyen los rendimientos en el crecimiento de los pollos (Sobamiwa et al., 1994).

- **Producción de biocombustibles**

La producción de fuentes de energía a partir de biomasa está creciendo de forma exponencial en los últimos años debido a la crisis en el sector energético y a las demandas sociales de energías limpias provocadas por la alerta global asociada al cambio climático. Los biocombustibles son la manera costo-eficiente más efectivas para reducir emisiones de carbono, puesto que la disminución del dióxido de carbono producirá un impacto positivo en el efecto invernadero, reduciendo así la contaminación ambiental derivada por la quema de combustibles fósiles (Macias et al., 2022). El alto contenido en azúcares reductores, carbohidratos y fibra de los diferentes residuos del cacao posibilitan su utilización como materia prima para la generación de etanol y otros biocombustibles. Los subproductos y residuos del cacao como fuente de biomasa para la generación de combustible y energía han sido ampliamente estudiados (Carvajal et al., 2018); sin embargo, el alto contenido en cenizas puede suponer una

limitación para la combustión de estas materias, especialmente en el caso de las vainas de mazorca de cacao (Martínez et al., 2012).

Igbinador & Onilude (2013) han revisado los aspectos clave de la utilización de las vainas de las mazorcas del cacao para la producción de bioetanol. En esta revisión se pone de manifiesto la importancia de los pretratamientos para transformar la lignocelulosa en fuentes de carbono utilizables durante la fermentación. La producción de bioetanol a partir de la vaina de la mazorca del cacao ha permitido determinar valores teóricos de rendimiento del 51,45% (Hernández-Mendoza et al., 2021). Sin embargo, el costo de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulosa puede ser muy elevado (Pantoja, 2015).

Además de etanol, el empleo de subproductos, en concreto la vaina de la mazorca del cacao, resulta interesante para la producción de biogás, en el que la fermentación anaerobio-dirigida por bacterias acetogénicas y metanogénicas produce como componentes principales metano, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y vapor de agua (Koido et al., 2018). Nuevamente se pone de manifiesto la importancia de unos adecuados pretratamientos para mejorar los rendimientos. En este sentido, la aplicación de tratamientos con peróxido de hidrógeno mejoró en más de un 70% los rendimientos en biogás a partir de cáscara de mazorca de cacao a los tratamientos ácidos (Dahunsi et al., 2019a; 2019b). En el estudio de Valladares-Diestro et al. (2022), el pretratamiento enzimático de la vaina de mazorca de cacao y la fermentación con inóculos de *Candida tropicalis* y *S. cerevisiae* permitió obtener rendimientos en etanol de hasta 45 g por kilo de materia prima. Además de las mazorcas del cacao, su codigestión con hojas de cacao también ha producido buenos rendimientos en la generación de biogás (Suhartini et al., 2021). Por otra parte, se ha evaluado comparativamente con otras fuentes la posibilidad de utilizar los residuos del cacao para la producción bioquímica de hidrógeno que, como ventajas, tiene una alta eficiencia energética, y su combustión no genera emisiones contaminantes (Rangel et al., 2021).

Además de la vaina de mazorca de cacao, el mucílago, gracias a su composición, permite la producción de bioetanol. Este residuo puede actuar como sustrato para proporcionar biogás, y contiene altos niveles de azúcares, fibras, proteínas y nutrientes (Rojas et al., 2020). En este sentido, los trabajos de Delgado-Noboa et al. (2021) y Romero et al. (2018) ponen de manifiesto la viabilidad de utilizar este subproducto, obteniendo producciones de bioetanol de hasta 23 g/L.

Una de las últimas aplicaciones de las vainas de cacao en este ámbito ha sido la producción de biobutanol. Muharja et al. (2023) ponen de manifiesto la importancia de los pretratamientos de depectinación, delignificación y tratamientos enzimáticos para alcanzar unos rendimientos adecuados, llegando a una producción de 20,4 g/L.

- **Biodetoxicación**

Dentro de las soluciones sostenibles para reducir la contaminación ambiental, especialmente de los acuíferos, está el empleo de subproductos agrícolas como agentes de biodetoxicación. Tal es la importancia de las propiedades absorbentes de la vaina de mazorca del cacao que Eletta et al. (2020) revisaron sus aplicaciones en este ámbito en forma de bioadsorbente, con o sin modificaciones químicas, y como base para la producción de carbón activo. Las investigaciones ponen de manifiesto las excelentes propiedades adsorbentes frente a

gran parte de los metales pesados (López et al., 2022; Tejeda-Tovar et al., 2022) y tintes (Fioresi et al., 2017) más preocupantes a nivel ambiental. Por su parte, el mucílago de cacao en concentraciones adecuadas es eficaz en sustitución parcial del  $\text{FeCl}_3$  en la eliminación de la carga contaminante de las aguas residuales que se producen en la obtención tradicional del almidón de yuca (Andrade, 2021).

- **Usos cosméticos**

Gracias a la riqueza en sustancias bioactivas de los subproductos del cacao se ha planteado su uso cosmético. En este sentido, Švarc-Gajić et al. (2023) obtuvieron, mediante extracción con agua supercrítica, extractos que estuvieron caracterizados por su adecuado contenido en compuestos fenólicos (37–45 mg GAE/g) y flavonoides (14–21 mg RE/g). Las actividades antioxidantes se cuantificaron mediante los DPPH ( $\text{IC}_{50} \sim 11\text{--}13 \mu\text{g/mL}$ ) y ABTS ( $\text{IC}_{50} \sim 7\text{--}9 \mu\text{g/mL}$ ). Con estos extractos se realizaron formulaciones de cremas con propiedades de protección solar. Además, Karim et al. (2016) demostraron las propiedades de extractos provenientes de la vaina del cacao para el tratamiento de las arrugas de la piel.

Otro uso interesante a nivel cosmético es el aprovechamiento de las cenizas de la vaina del cacao, con alto contenido en potasa, para la elaboración de jabones (Gyedu-Akoto et al., 2015).

- **Extracción de componentes bioactivos**

Los subproductos de la producción del cacao constituyen una interesante fuente de compuestos bioactivos. Campos-Vega et al. (2018) y Rojo-Poveda et al. (2020) han revisado el aprovechamiento de la vaina de la mazorca del cacao y la cáscara de la semilla, respectivamente, como fuente de compuestos bioactivos. Entre los subproductos del cacao, la vaina de la mazorca, debido a su importancia, ha sido la más ampliamente caracterizada en cuanto al contenido de compuestos funcionales, seguido de la cáscara de las semillas. A continuación, se muestran las fracciones de compuestos que más interés han suscitado en la comunidad científica, como son las proteínas, la fibra, los polifenoles y las metilxantinas.

- **Proteínas**

Las proteínas son los compuestos menos estudiados entre los obtenidos a partir de subproductos del cacao. Los contenidos medios de proteínas en las vainas son del 8,5%, inferiores a los encontrados en la cáscara de las semillas situados en 10,3-27,4% (Rojo-Ventura et al., 2020; Bonvehi & Coll, 1999). Awang et al. (2010) han identificado 44 proteínas de las más de 700 detectadas mediante análisis con MALDI-TOF/TOF MS. La función de estas proteínas está relacionada con el metabolismo celular y la producción de metabolitos secundarios. Algunos autores han propuesto la cáscara de las semillas del cacao como fuente para la extracción de proteínas (Okiyama et al., 2019), que presentan con una adecuada digestibilidad (Bonvehi & Coll, 1999). Los aminoácidos esenciales están representados en su totalidad, y suponen el 44,07% de los aminoácidos (Bonvehi & Coll, 1999; Chung et al., 2003).

## - **Fibra**

En cuanto a la fibra, se puede afirmar que los valores de fibra total dietética (39,2-66,3 g/100 g), fibra dietética soluble (7,0-16,9 g/100 g) y fibra dietética insoluble (28,3-50,4 g/100 g) son similares entre la vaina y las cáscaras de las semillas, aunque los valores de la fibra soluble son ligeramente superiores en la cáscara (Rojo-Poveda et al., 2020). Por su parte, los contenidos de fibra del mucílago son significativamente inferiores, con valores de fibra total dietética de 16,7 g/100 g; fibra dietética soluble de 16,1 g/100 g, y fibra dietética insoluble de 0,7 g/100 g (Martínez et al., 2012). Además de su contribución al tránsito intestinal, se ha asociado el consumo de fibra de subproductos del cacao con la reducción del riesgo cardiovascular mediante la reducción de los niveles de colesterol y triacilglicéridos, y la reducción del riesgo de diabetes por la reducción de la absorción de glucosa (Lecumberri et al., 2007; Nsor-Atiana et al., 2012).

Entre los componentes de la fibra, las pectinas han sido objeto de un amplio estudio, especialmente para su extracción de las vainas del cacao. Los trabajos de Chan & Choo (2013), Jarrín-Chacón et al. (2023) y Vriesmann et al. (2011a; 2012) ponen de manifiesto la importancia del método de extracción tanto para el rendimiento como para la composición y el grado de metilación. Según estos trabajos, el agua caliente acidificado con ácido cítrico mejora los rendimientos hasta valores superiores al 10%, con elevado porcentaje de ácido urónico y grado de metoxilación que la simple aplicación de agua caliente. Similares resultados se han obtenido con el empleo de 40  $\mu\text{L g}^{-1}$  de celulasas (Hennessey-Ramos et al., 2021). Los valores de ácido urónico se incrementaron hasta el 80% empleando extracción con ácido nítrico, con alto grado de esterificación y acetilación de las pectinas (Vriesmann et al., 2011b). Con estas propiedades, se ha propuesto el uso de estas pectinas como gelificantes en condiciones ácidas (Campos-Vega et al., 2018; Vriesmann & Petkowicz, 2013) así como su aplicación como excipientes en formulaciones farmacéuticas (Adi-Dako et al., 2018; Samuel, 2006). Aunque hay que señalar que las pectinas de las vainas y de la cáscara de la semilla se ha considerado de baja calidad y sus rendimientos son inferiores a otras fuentes de extracción de las pectinas como pueden ser los cítricos (Arlorio et al., 2001; Chan et al., 2013; Mollea et al., 2008).

## - **Polifenoles**

Los polifenoles son los compuestos bioactivos que, junto con la fibra, más han atraído la atención de los investigadores sobre los subproductos del cacao. Los subproductos del cacao son especialmente interesantes por el contenido en flavanoles, que son un grupo especial dentro de los polifenoles flavonoides (Wollgast & Anklam, 200). Los efectos beneficiosos para la salud de la ingesta de polifenoles incluyen su poder antioxidante (Davison et al., 2012; Gu et al., 2006; Othman et al., 2007; Schinella et al., 2010) ya que actúan como secuestradores de radicales libres y reducen el estrés oxidativo. Además, se han asociado con procesos antiinflamatorios, reducción de la diabetes y otras enfermedades como el cáncer, neurodegenerativas y de índole cardiovascular (Martín et al., 2016; Rossin et al., 2019; Vauzour et al., 2010), además de propiedades antibacterianas y antivirales (Kamei et al., 2016; Smullen et al., 2007).

La composición en fenoles de la vaina de la mazorca del cacao muestra una diversidad de compuestos entre los que se encuentran fenoles ácidos (derivados del ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido cumárico y ácido p-hidroxibenzoico), flavonoides (apinegina, ramnetina,

derivados del kaempferol, y derivados de flavonas, quercetina, catequina y epicatequina, luteolina y linarina), tal y como han descrito Karim et al. (2014a) y Valadez-Carmona et al. (2017). Los rendimientos en la extracción varían de forma significativa en función de los métodos empleados, los disolventes, las variedades y el origen de los productos con valores de compuestos fenólicos totales comprendidos entre 2 y 57 mg eq. ácido gálico/g de materia seca (Arlorio et al., 2014; Hernández-Hernández et al., 2018; Karim et al., 2014b; Martínez et al., 2012; Soares et al., 2022; Švarc-Gajić et al., 2023; Valadez-Carmona et al., 2017; 2018), y 4-22 mg eq. de rutina/g de materia seca (Karim et al., 2014a; Švarc-Gajić et al., 2023).

Por su parte, el contenido en fenoles totales de la cáscara de la semilla del cacao presenta valores similares a la vaina, con valores comprendidos entre 3,12 y 94,5 mg eq. ácido gálico/g de cáscara de semilla seca; mientras que los valores de flavonoides totales presentan valores superiores en la cáscara, con cifras comprendidas entre 1,6 y 40,7 mg eq. rutenina/g de cáscara seca (Llerena et al., 2023; Rojo-Poveda et al., 2020; Soares et al., 2022; Yapó et al., 2013). De forma específica, los polifenoles más abundantes de la cáscara de las semillas del cacao son procianidinas y catequinas. Entre ellas destacan la (-)-epicatequina como la más abundante, flavan-3-ol, (+)-catequina y sus dímeros, entre otros (Barbosa-Pereira et al., 2018; González et al., 2019; Rojo-Poveda et al., 2019). Por su parte, el mucílago presenta valores inferiores tanto de compuestos fenólicos totales como de flavonoides totales. Los principales compuestos identificados con la catequina, epicatequina y las procianidinas B1, B2 y C1 (Llerena et al., 2023).

Las aplicaciones de los polifenoles en los alimentos y cosméticos están asociados a su poder antioxidante (Gabbay et al., 2017). Estos compuestos fenólicos presentan interesantes propiedades antioxidantes (Aranaz et al., 2019) y antibacterianas frente a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Bubonja-Sonje et al., 2011; Kayaputri et al., 2019; Nsor-Atindana, 2012).

### **Metilxantinas**

Las principales metilxantinas de los subproductos del cacao son la teobromina y la cafeína. Ambos compuestos son alcaloides con múltiples actividades biológicas. Se han relacionado con la mejora del ánimo debido a su activación del sistema nervioso central. Tienen propiedades diuréticas, anticancerígenas y antiponderales (Heck & De Mejía, 2007). Si bien el exceso de cafeína tiene repercusiones negativas para la salud, se utiliza de forma habitual como aromatizante en bebidas y en formulaciones farmacéuticas. Por su parte, la teobromina presenta mucho menos impacto que la cafeína a nivel del sistema nervioso central, y posee propiedades relajantes y activadoras del corazón (Baggott et al., 2013).

Las concentraciones de teobromina en la cáscara de la semilla se sitúan en torno a 4 mg/g de cáscara, aunque pueden incrementarse significativamente tras la fermentación (Hernández-Hernández et al., 2018). Es muy interesante para las aplicaciones médicas la proporción entre teobromina y cafeína, que están entre 5 y 7 veces superior de la teobromina (Rojo-Poveda et al., 2019), ya que se ha observado la relación del consumo de las metilxantinas del cacao con el aumento de los niveles de epicatequinas en plasma (Sansone et al., 2017).

- **Películas, recubrimientos comestibles, bioplásticos y agentes encapsulantes**

Debido a las pérdidas en productos hortofrutícolas durante su comercialización por el manejo postcosecha inadecuado y las alteraciones fisicoquímicas y microbiológicas, en los últimos años se ha buscado el desarrollo y la producción de bioplásticos, películas y recubrimientos comestibles biodegradables como una forma de protección. Mientras que los recubrimientos se definen como una capa fina y continua que es directamente aplicada sobre los alimentos, las películas comestibles están previamente preformadas y se colocan alrededor o entre alimentos (Paidari et al., 2021). Estos bioplásticos, películas y recubrimientos comestibles están hechas con materiales como carbohidratos, proteínas o lípidos, con características físicas y mecánicas similares a los envases no degradables, pero con la ventaja de funcionar como barreras bioactivas, ya que, mediante la adición de extractos vegetales, pueden presentar actividad antimicrobiana (Solano et al., 2018).

Entre los ejemplos del aprovechamiento de los subproductos del cacao en este ámbito encontramos la mejora de la formulación de recubrimientos de alginato con nano fibrillas de celulosa de la cáscara de la semilla del cacao, que fueron aplicadas en arándanos. Los resultados de la adición mejoraron las propiedades mecánicas y ópticas de los recubrimientos, además de tener un impacto positivo en la calidad de los arándanos (Medina-Jaramillo et al., 2020). Se han elaborado recubrimientos a base de pectinas de las vainas (Nazir & Sayuti, 2018) y de las cáscaras del cacao. Su aplicación a tomate ha permitido mantener la calidad y, con ello, prolongar su vida útil (Pholsin et al., 2024).

Los subproductos del cacao se han utilizado del mismo modo para la elaboración y mejora de bioplásticos en combinación con almidón de la semilla de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) incluyendo celulosa microcristalizada de la vaina del cacao (Lubis et al., 2017). Otra aplicación ha sido emplear una base polimérica reciclable (polietileno y polipropileno) con material polimérico obtenido de la vaina de cacao (De Andrade et al., 2021). Otro desarrollo exitoso de bioplásticos se ha realizado con la combinación de 75% de celulosa de vainas de cacao y 25% de fibra de bagazo de caña, presentando las películas obtenidas adecuadas propiedades fisicoquímicas y reológicas (Azmin & Nor, 2020).

Finalmente, se puede destacar el aprovechamiento de las vainas del cacao, debido a sus propiedades antioxidantes y biocidas (Lateef et al., 2016), como agente encapsulante para la protección de probióticos (Hutomo et al., 2012).

- **Producción de microorganismos**

El mucílago de cacao (2%) combinado con melaza (2%) ha sido utilizado como prueba alternativa de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (*Btk* HD-1) para la producción de un biopesticida. Los recuentos medios obtenidos de  $1,6 \times 10^9$  UFC/mL para células y  $2,3 \times 10^9$  UFC/mL para esporas muestran las adecuadas propiedades de este medio para la producción del bioplaguicida Btk HD-1 (Akpo et al., 2020). Del mismo modo, el mucílago de cacao ha sido empleado para la producción de celulosa bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus*, aunque los resultados mostraron la necesidad de suplementación con nitrógeno y de regular el pH para alcanzar los mayores rendimientos (Saavedra et al., 2021). Otras moléculas producidas por microorganismos a partir de subproductos de cacao son goma xantana producida

por *Xhantomonas campestris* (Diniz & Druzian, 2012), lipasas por *Aspergillus niger* (Amorin et al., 2012) y fructosiltransferasa por *Rhizopus stolonifer* (Lateef et al., 2008).

Por otro lado, la utilización de la vaina del cacao ha mostrado ser efectiva para la producción de xilitol por la levadura *Candida boidinii*, produciendo rendimientos de 0,52 g/g (Santana et al., 2018).

- **Nuevas formulaciones de alimentos**

La innovación está actualmente presente en todas las áreas del desarrollo, particularmente en la industria de los alimentos. La innovación requiere esfuerzo creativo, audacia, habilidades tecnológicas y/o comerciales. En la evolución de los alimentos y de los procesos asociados, han existido muchos fracasos, pero también muchas innovaciones e innovadores exitosos (Valenzuela & Valenzuela, 2015). En los países desarrollados, la gestión del mercado en cualquier oferta de productos se ha visto modificada en los últimos años como consecuencia de los habituales cambios en los patrones de consumo y las modificaciones en los gustos y preferencias de los consumidores. Un ejemplo paradigmático de este cambio, por su carácter estratégico para todas las economías, lo representa el sector agroalimentario, que junto con estas modificaciones se ha visto afectado por relevantes crisis alimentarias y por nuevas acepciones del alimento por parte del consumidor. Además, el continuo aumento de la producción junto al estancamiento de su demanda ha dado lugar a una saturación del mercado. Esta situación ha provocado que los productores y transformadores de la industria en general y de la agroalimentaria en particular, se hayan visto en la necesidad de innovar y desarrollar nuevos productos para satisfacer las necesidades y deseos de los mercados y mejorar la posición competitiva de las empresas (Figueroa et al., 2013).

Entre las principales innovaciones en la industria alimentaria destaca el sector de los alimentos funcionales que son todos aquellos alimentos o productos alimenticios que además de su aporte natural de sustancias nutritivas, proporcionan un beneficio específico en la salud de la persona. Para ello deben contener componentes bioactivos, pero además deben ser biodisponibles y esto depende de características propias del compuesto como así también de la matriz estructural alimentaria donde se encuentre. No constituyen un grupo de alimentos como tal, sino que resultan de la adición, sustitución o eliminación de ciertos componentes a los alimentos habituales, si bien en un concepto amplio de alimento funcional se incluyen no sólo los productos manufacturados, sino también ciertos alimentos tradicionales (aceite de oliva, tomate, legumbres, etc.) que contienen componentes con “otras propiedades” beneficiosas para la salud que los avances científicos van descubriendo, más allá de las conocidas desde el punto de vista nutricional clásico (Aguilera et al., 2007).

La elaboración de nuevos productos derivados del cacao, con impacto en el mercado alimentario, farmacéutico y cosmético no ha dejado de crecer en los últimos 20 años (Gómez-Molina et al., 2019), como demuestran el número de patentes registradas. Entre ellas se encuentra una elevada gama de productos tanto en la industria alimentaria, como en la farmacéutica y cosmética. Sin embargo, a pesar de la riqueza en sustancias bioactivas de los subproductos del cacao, principalmente fibra dietética y polifenoles, aún son escasas las aplicaciones de estos compuestos en la formulación de alimentos (Lu et al., 2018). La cáscara de la semilla de cacao presenta unas adecuadas propiedades tecno-funcionales gracias a su composición en proteínas, lípidos, fibra dietética y moléculas antioxidantes, por lo que

presentan un gran potencial para el enriquecimiento de alimentos tradicionales. En el caso de la vaina de cacao, es esencial la inactivación térmica de las enzimas para preservar las propiedades antioxidantes asociadas a los compuestos fenólicos. Además, el alto contenido en fibra dietética con una adecuada capacidad de retención de agua hace de la vaina de cacao un excelente candidato para sustituir emulsificantes y retenedores de humedad (Delgado-Ospina et al., 2021).

Los subproductos del cacao han sido empleados como ingredientes para la formulación de alimentos. En este caso, el mucílago o exudado del cacao ha sido el principal subproducto utilizado para este fin orientado a la elaboración de nuevas bebidas. En este sentido, Arciniega-Alvarado (2020) propuso la comercialización directa del mucílago del cacao mezclado con distintas cantidades de agua tras su pasterización. Los resultados del análisis sensorial mostraron una aceptación moderada por parte de los 30 catadores empleados. Otros autores proponen el empleo del mucílago del cacao para la inclusión o desarrollo de diversos tipos de bebidas. Por ejemplo, se han propuesto sustituciones del jugo de yaca de hasta el 15% con mucílago de cacao con función estabilizadora, observando propiedades sensoriales similares al jugo original (Flor et al., 2023). Igualmente se han ensayado mezclas del 10 y 20% de mucílago y pulpa de cacao con zumos de piña y mango como propuesta de bebida no fermentada (Vélez & Moyano, 2023). Se ha planteado el desarrollo de una bebida funcional con soja, mucílago de cacao y diferentes edulcorantes como sacarosa, panela y stevia, obteniendo interesantes propiedades sensoriales (Moreira-Macías et al., 2023). Además, se han elaborado “vinos” directamente de la fermentación del mucílago con *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo 11, 2° de alcohol y una coloración naranja cálido y unas particulares propiedades sensoriales (Tinh et al., 2016, Zigue et al., 2022). Otra propuesta de bebida con potencial funcional es la kombucha elaborada con mucílago de cacao, a la que se inoculó con 3% de SCOBY. Esta bebida presentó unos elevados valores de actividad antioxidante asociados a los contenidos en compuestos fenólicos (Yuliana et al., 2023).

En el ámbito de las bebidas se encuentran trabajos en los que se ha utilizado la pulpa del cacao. La incorporación de pulpa de cacao en bebidas agrega valor al subproducto del cacao y ofrece nuevas opciones con un alto valor nutritivo en bebidas para niños y adultos. La pulpa de cacao se puede fortificar con nutrientes tales como vitaminas de otras fuentes o el jugo se puede mezclar con otros jugos de frutas como la piña que son buenas fuentes de vitaminas. La bebida resultante contiene niveles crecientes de calcio, hierro y fósforo, pero menor cantidad de proteínas, carbohidratos y vitamina C (Afolabi et al., 2015). En el estudio de Klis et al. (2023) se fermentó 10 % de pulpa de cacao con *Laetiporus persicinus*, consiguiendo una bebida con toques frutales, florales, dulces, a melocotón asociados a la presencia de los compuestos volátiles como (R)-Linalool, metil benzoato, 2-fenyletanol, 5-butil-2(5H)-furanona y (E)-nerolidol. Además, las valoraciones sensoriales mejoraron sensiblemente tras la fermentación.

Finalmente, la bibliografía muestra la opción de utilizar la cáscara de las semillas de cacao para la elaboración de té. San et al. (2022) caracterizaron la actividad antioxidante de la cáscara de semilla de cacao sometida a diferentes tratamientos térmicos obteniendo unos interesantes valores en las determinaciones de contenido fenólico total, contenido total de flavonoides, secuestro de radicales libres (DPPH), capacidad de reducción de hierro (FRAP) y la capacidad de quelación de iones ferrosos (FIC). La temperatura de tostado influyó tanto en las propiedades antioxidantes como en el perfil de sabor del té de cacao resultante. Se observó que las propiedades antioxidantes se mantuvieron en valores deseables hasta temperaturas de

tostado de 100 °C. El té de cacao elaborado presentó un mayor contenido de teobromina y un contenido de cafeína mucho más bajo en comparación con el té verde.

El alto contenido en azúcares, y con ello su sabor dulce ha permitido postular al mucílago del cacao para su uso en preparaciones alimenticias como sustituto natural del azúcar refinado (Guirlanda et al., 2021).

Una interesante propuesta para el mucílago de cacao (915 g) y la placenta del cacao (165 g) es la elaboración de mermelada (Anvoh & Gnakri, 2009). Tras el proceso de elaboración y la incorporación de 750 g de azúcar se obtuvieron 67,14°Brix, pH de 3,14, 5,13% de grasa, y 5,26% de celulosa. Las valoraciones sensoriales fueron ligeramente inferiores al comparar con mermelada de albaricoque. Igualmente se ha propuesto la elaboración de sirope con pulpa de cacao adicionado de azúcar de caña (Firdaus et al., 2022). Los resultados del análisis sensorial fueron satisfactorios, sin embargo, la carga microbiana limitó su consumo a 5 días en refrigeración.

La inclusión de polvo de vaina de cacao en masas panarias con el objetivo de incrementar los porcentajes de fibra dio como resultado panes más densos y duros, y de color más oscuro. Sin embargo, cuando la incorporación de polvo de vaina de cacao se limitó al 5% las valoraciones sensoriales fueron altas (Amir et al., 2013). Otro interesante trabajo ha propuesto la sustitución parcial de grasas vegetales (entre un 50 y 75% de sustitución) por polvo de vaina de cacao pretratado enzimáticamente en magdalenas de chocolate (Martínez-Cervera et al., 2011). Algunas de las propiedades de las magdalenas fueron mejoradas respecto a los controles como la textura y la humedad, aunque presentaron menor crecimiento, un sabor ligeramente amargo y la superficie pegajosa.

Recientemente se ha explorado el potencial que tiene el mucílago de cacao como bioconservante en carne de ternera (Morante-Carriel et al., 2023). Esta capacidad de prolongar la conservación de la carne está asociada a la población microbiana desarrollada durante la fermentación del mucílago, en el que diversas especies de lactobacillus tienen un papel esencial (Meersman et al., 2013; Papalexandretou et al., 2011). Estas bacterias, y las bacteriocinas que producen tienen la capacidad de controlar el desarrollo de bacterias patógenas como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* entre otras (O`Sullivan et al., 2002). Además, el uso de ingredientes funcionales en productos cárnicos ofrece a los procesadores la oportunidad de potenciar el valor funcional, nutricional e higiénico de sus productos (Kausar et al., 2019). Los polifenoles obtenidos de los productos del cacao podrían aportar características deseables a la carne gracias a su poder antioxidante y antimicrobiano como se ha demostrado con extractos fenólicos del olivo (Fasolato et al., 2016; (Munekata et al., 2020).

En la actualidad se ha explorado el potencial de los subproductos del cacao como conservantes de alimentos. En este sentido podemos citar los trabajos de Desvita & Faisal (2022) y Desvita et al. (2023) en el que proponen que la obtención de humo líquido procedente de combustión de los subproductos del cacao presenta interesantes propiedades antimicrobianas frente a *E. coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

### **III. Objetivos**

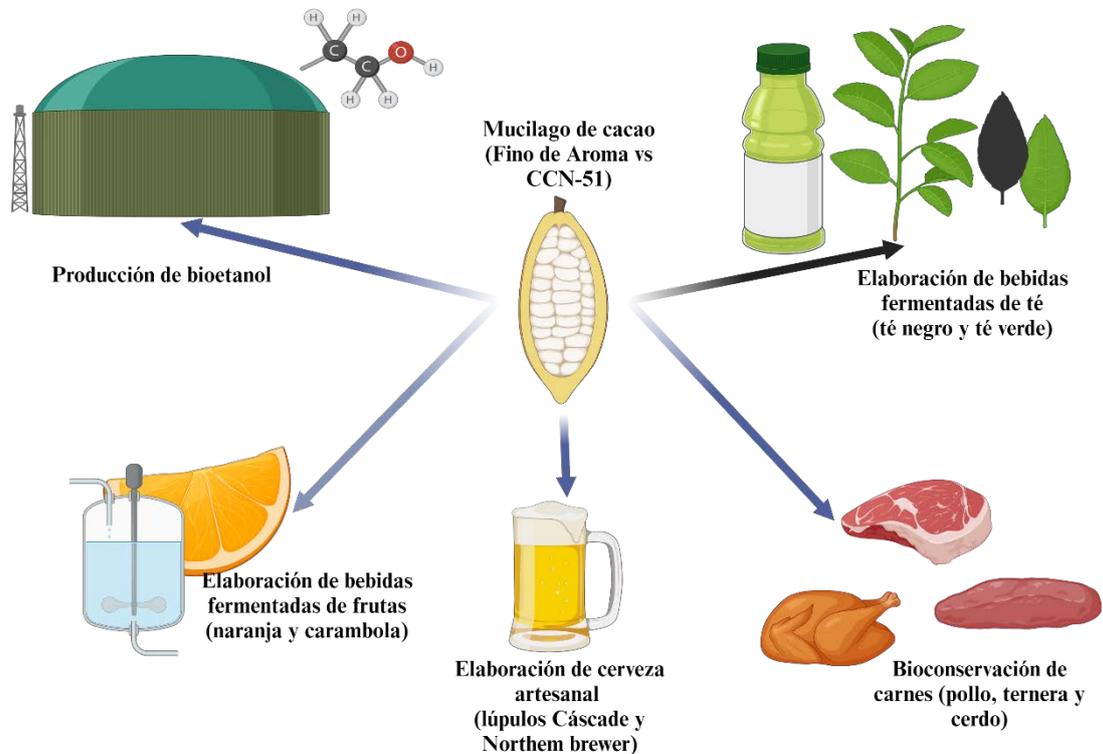
### III.1. Objetivo General

El objetivo general de esta tesis doctoral es revalorizar el mucílago del cacao, un subproducto de la industria de la producción del cacao, comparando las dos variedades principales cultivadas en Ecuador, la variedad tradicional Fino de Aroma, y la nueva variedad CCN-51 (Figura III.1).

### III.2. Objetivos específicos:

Para el desarrollo del objetivo principal de esta tesis doctoral se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Explorar la disponibilidad del mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 para ser empleadas en la producción de bioetanol.
- Evaluar el efecto de la adición de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 en la elaboración de bebidas fermentadas de frutas.
- Evaluar el efecto de la adición de mucílago de cacao en la elaboración de bebidas fermentadas a base de té.
- Evaluar el efecto de la adición de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 para producir cervezas artesanales con dos tipos de lúpulo.
- Valorar el efecto antimicrobiano del mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 en la bioconservación de carnes para consumo humano



**Figura III.1.** Esquema general de los objetivos de la presente tesis doctoral.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

## IV.1. Diseño experimental

En la Tabla IV.1 se muestra de forma resumida los ensayos llevados a cabo en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Como se detalla en la tabla, en este trabajo se ha planteado la revalorización de uno de los principales residuos en la producción del cacao como es el mucílago del cacao. En este sentido, se ha evaluado la adecuación del mucilago del cacao de las dos variedades principales cultivadas en Ecuador, la variedad Fino de Aroma, también denominada Nacional, y la variedad CCN-51. Para ello se han planteado cinco aplicaciones diferentes:

- Producción de bioetanol
- Elaboración de bebidas fermentadas de frutas, en concreto naranja y carambola.
- Elaboración de bebida fermentada de té, empleado como materias primas tanto té verde como té negro.
- Elaboración de cerveza tradicional, evaluando asimismo la adecuación de dos tipos de lúpulo, la variedad Cascade y la variedad Northern Brewer.
- Aumentar la conservabilidad de carnes de ternera, cerdo y pollo.

En esta tabla se muestran las principales modificaciones ensayadas en cuanto a la concentración de los diferentes ingredientes. Además, se indican los principales parámetros físico-químicos, microbiológicos y sensoriales evaluados en cada producto.

En cada caso, se trata de innovaciones pensadas en el bienestar y la satisfacción del consumidor, al mismo tiempo que se busca reducir el impacto ambiental de la producción del cacao en Ecuador.

Los análisis de estos estudios se ejecutaron en los laboratorios correspondientes de bromatología, suelos, química básica, biotecnologías y microbiología, que se encuentran ubicados en la sede de la Universidad Técnica del Estado de Quevedo, finca experimental “La María”, en el km 7 1 /2 de la vía Quevedo – El Empalme, campus San Felipe, Cantón Mocache, Provincia de Los Ríos (Ecuador).

**Tabla IV.1.** Esquema general de los diseños experimentales del desarrollo de los productos con inclusión de mucilago de cacao.

<i>Producto Base</i>	<i>Formulaciones</i>	<i>Concentraciones</i>	<i>Parámetros Fisicoquímicas</i>	<i>Parámetros Microbiológicos</i>	<i>Análisis sensoriales</i>
<i>Bioetanol</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variedades de cacao: CCN-51 y Fino de aroma</li> <li>• Inóculo: <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> </ul>	Residuos sólidos y líquidos Porcentaje de inóculo: 0%, 0,01%, 0,05%	Turbidez, densidad, calor específico, producción de bioetanol, pH, sólidos totales, acidez y grados alcohólicos	-	-
<i>Bebidas fermentadas de frutas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variedades de cacao: CCN-51 y Fino de aroma</li> <li>• Frutas: Naranja y Carambola</li> </ul>	Mucílago: 10 y 15%	pH, acidez titulable, sólidos solubles, sólidos suspendidos, transmitancia y absorbancia, y densidad	-	Color, olor, sabor, dulzor y astringencia
<i>Bebidas fermentadas de té</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿Variedad de Cacao?</li> <li>• Té: verde y Negro</li> <li>• Inóculo: Scoby</li> </ul>	Mucílago: 15, 20 y 30%	pH, acidez titulable, turbidez, sólidos solubles, contenido en alcohol, densidad, absorbancia y transmitancia	Levaduras, <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli</i> .	Color, olor, sabor, dulzor, astringencia
<i>Cerveza artesanal</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variedades de Cacao: CCN-51 y Fino de aroma</li> <li>• Variedades de lúpulo: Cascade y Northem brewer</li> </ul>	Mucílago: al 20% y 30%	pH y la acidez, la turbidez, sólidos en suspensión, sólidos solubles, contenido en alcohol, densidad, colorimetría, absorbancia y transmitancia, grado de amargor, cantidad de espuma	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> Microorganismos totales	Color, olor, sabor, dulzor, astringencia
<i>Bioconservación de la carne</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variedades de cacao: CCN-51 y Fino de aroma</li> <li>• Carne de ternera, cerdo y pollo</li> </ul>	-	pH, acidez, humedad, capacidad de retención de agua, textura, colorimetría	Coliformes, mohos y levaduras, bacterias del ácido láctico	-

## **IV.2. Productos obtenidos con mucílago de cacao**

A continuación, se detallan los diseños experimentales realizados en el desarrollo de los 5 productos desarrollados con la inclusión de mucílago de cacao.

### **IV.2.1. Origen y extracción del mucílago de cacao**

Este trabajo pretende revalorizar el residuo mucilago de cacao. Para ello se trabajó con las dos principales variedades cultivadas en Ecuador. Estos mucílagos fueron obtenidos de la finca “Voluntad de Dios” que se encuentra en el sector Fumisa, vía camaronera, recinto Río Chila, ubicada en la provincia de Los Ríos en el sector Oeste, con una Altitud de 121 ms. n. m. También se recolecto el mucilago de comercializadoras de cacao ubicadas en el cantón Valencia, provincia de Los Ríos (Ecuador).

#### **Extracción del mucílago de cacao**

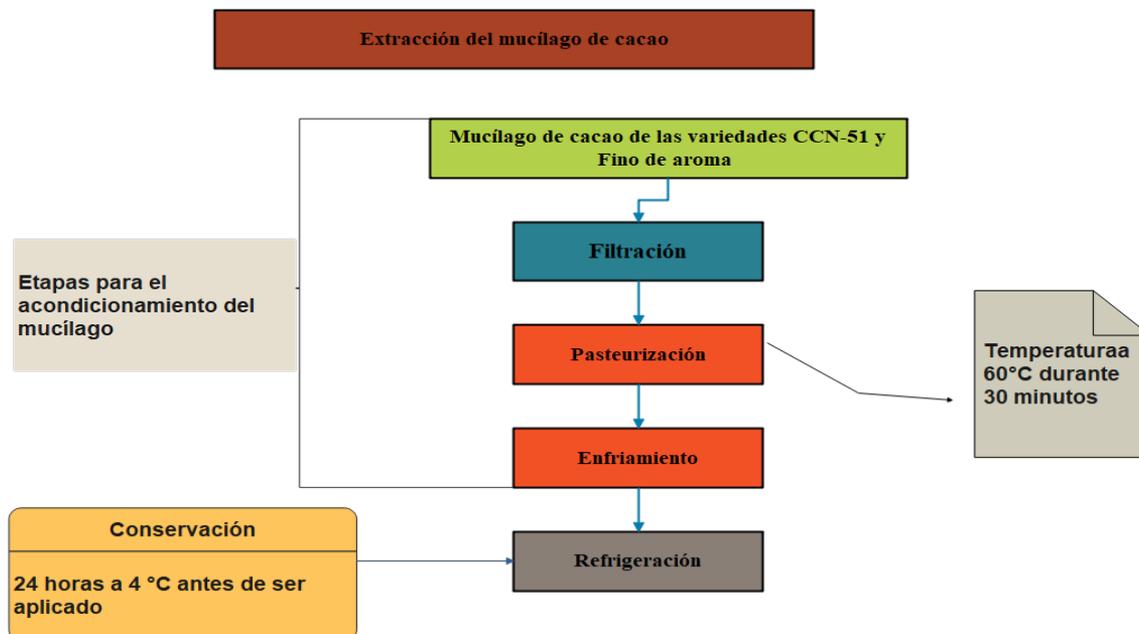
A continuación, se detallan las principales operaciones para la extracción de mucilago de cacao (Figura IV.2).

**Filtración:** En esta etapa consistió en la separación de residuos que quedan después de realizar la cosecha al momento de separar las semillas de la corteza, además de piedras u otras sustancias extrañas para lo cual se utilizó un filtro de manga.

**Pasteurización:** Al mucílago se incrementó su temperatura a 60°C durante 30 minutos para eliminar algún microorganismo que posiblemente se adhiriera durante la cosecha del cacao y posteriormente durante la extracción del mucílago ya que tiene contacto con pisos, drenajes y cajas de madera en las cuales se fermenta el cacao para que adquiera mayor aroma.

**Enfriamiento:** Disminución de temperatura para llevar a la siguiente etapa que es la refrigeración.

**Refrigeración:** El mucílago es envasado en envases de cristal ya que puede activarse las levaduras presentes en el cacao y por lo tanto se genera el proceso fermentativo incrementando la presión interna en el envase. En esta fase el mucílago se mantuvo durante 24 horas a 4 °C antes de ser aplicado a los diferentes procesos desarrollados en este trabajo.



**Figura IV.2.** Diagrama de flujo de la extracción de mucílago de cacao.

#### **IV.2.1.2. Análisis**

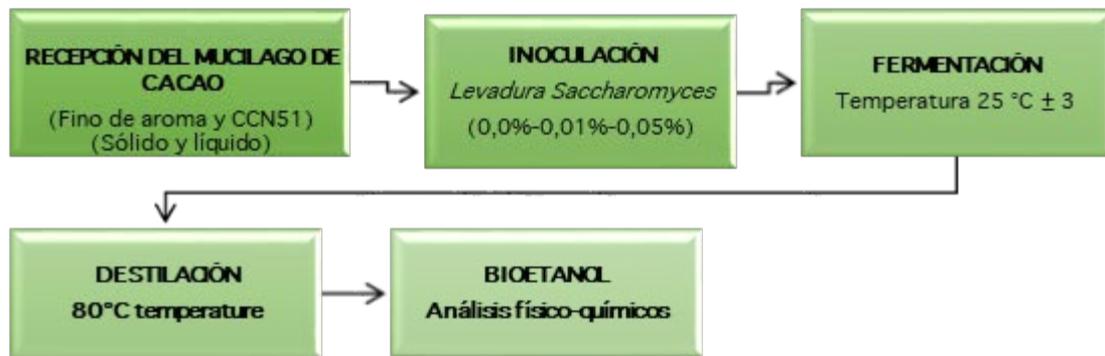
Para la caracterización del mucílago del cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 se realizaron los análisis de pH, % acidez, sólidos solubles totales, densidad, turbidez, sólidos en suspensión, colorimetría mediante el espacio CIElab, y absorbancia y transmitancia tal y como se describe en los epígrafes IV.3.

#### **IV.2.2. Producción de bioetanol a partir de residuos de cacao**

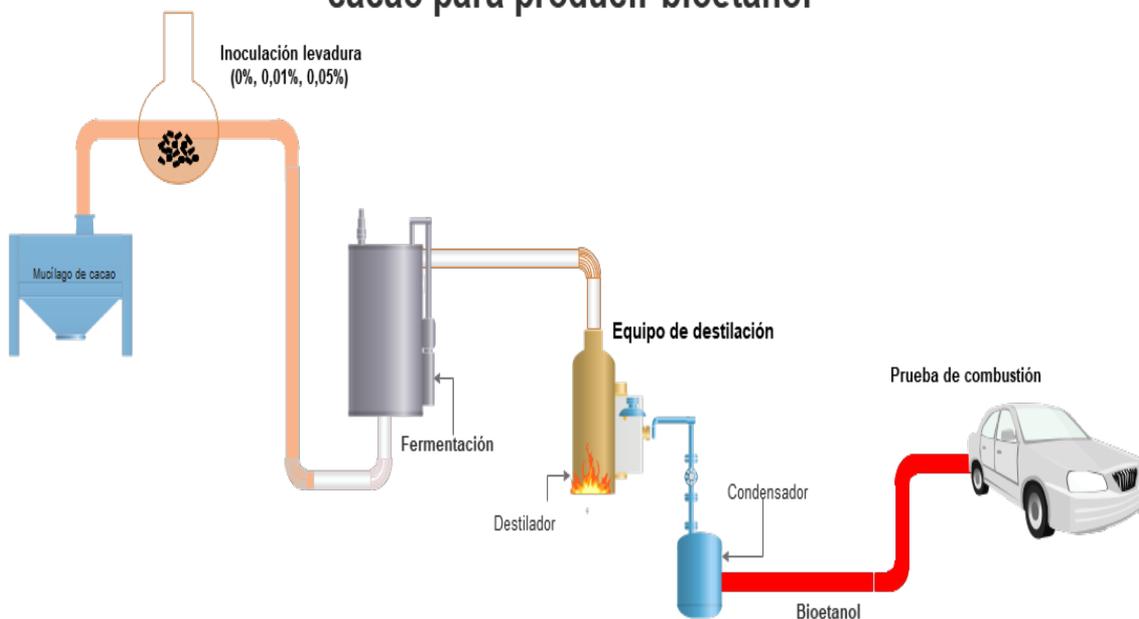
El bioetanol se obtuvo mediante el proceso de fermentación de residuos de dos variedades de cacao: Nacional y CCN51, los cuales fueron recolectados en forma de semilla y líquido en una comercializadora de cacao ubicada en Valencia, Los Ríos (Ecuador). Las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) fueron adquiridas en la empresa Beerland Store ubicada en la ciudad de Quito provincia de Pichincha.

##### **IV.2.2.1. Diseño experimental y etapas de la producción de bioetanol**

En la siguiente figura se muestra el esquema general del proceso de producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao (Figura IV.3).



## Degradación de azúcares del mucílago de cacao para producir bioetanol



**Figura IV.3.** Diagrama de flujo de la producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao.

**Recepción:** El cacao comercializado se depositó en cajas fabricadas en madera, con orificios que permiten la separación de las partes sólidas y líquidas de los granos de cacao. La forma líquida es el mucílago y la forma sólida son los granos de cacao. Se recogió el mucílago y el cacao sólido que se encontraba en los fermentadores de madera por separado. La materia prima fue sometida a un análisis inicial de pH y sólidos totales y posteriormente utilizada en fermentación

**Inoculación:** Las concentraciones de levadura (0%, 0,01%, 0,05%) *Saccharomyces cerevisiae* fueron aplicadas a cada experimento y se homogeneizó mediante un agitador magnético con placa calefactora de marca Farmalatina (Chile) para asegurar una distribución adecuada de la levadura a 25°C en 4000 mL de mucílago de cacao.

**Fermentación:** El proceso de fermentación se produce en anaerobiosis a una temperatura de 25±3 °C. Se colocó una válvula de CO<sub>2</sub> con esclusa de aire para controlar la producción de dióxido de carbono generada por la fermentación del mucílago en cada experimento. En esta fase, los azúcares del mucílago del cacao se convierten en etanol (Figura IV.4).



**Figura IV.4.** Fermentador para la producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao.

**Destilación:** Se realizó en un destilador simple construido por la carrera de Ingeniería Mecánica (Universidad de Quevedo, Ecuador), de 18 litros de capacidad y con un sistema eléctrico para regular la temperatura de destilación (80°C), y consta de un condensador para recirculación de refrigerante. Cada unidad experimental tardó aproximadamente 2 horas en la etapa de destilación (Figura IV.5).



**Figura IV.5.** Destilador para la producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao.

En base a esto, se analizaron fermentaciones de dos variedades de cacao (Fino de Aroma y CCN-51), tanto de los residuos sólidos como líquidos, con tres niveles de inoculación de levaduras de 0%, 0,01% y 0,05%. Las fermentaciones se efectuaron por duplicado a cada unidad experimental.

#### **IV.2.2.2. Análisis:**

Se realizaron los análisis fisicoquímicos relativos a la turbidez, densidad, calor específico, producción de bioetanol, pH, sólidos totales, acidez y grados alcohólicos. Los análisis se realizaron por duplicado. Los análisis se realizaron tal y como se describen en las secciones IV.3.

#### **IV.2.3. Elaboración de bebidas fermentadas de naranja y carambola con adición de mucílago de cacao**

La materia prima para la elaboración de la bebida fermentada de mucílago de cacao combinada con carambola y naranja se adquirieron en los mercados locales de la ciudad de Quevedo (Ecuador). Todas las frutas presentaron un estado de maduración similar, y estaban

libres de plagas y alteraciones. Los mucílagos de cacao se adquirieron en la ciudad de Valencia en el Recinto La Familia finca “La Matilde” (Ecuador).

#### **IV.2.3.1. Diseño experimental y etapas de la elaboración de las bebidas fermentadas de frutas**

Para el diseño experimental se utilizó un diseño aleatorio, con arreglo factorial A\*B\*C, cuyos factores fueron:

A= tipos de frutas (naranja y carambola);

B= concentraciones de mucílago de cacao (10% y 15%);

C= tipo de mucílago (CCN-51 y Fino de aroma).

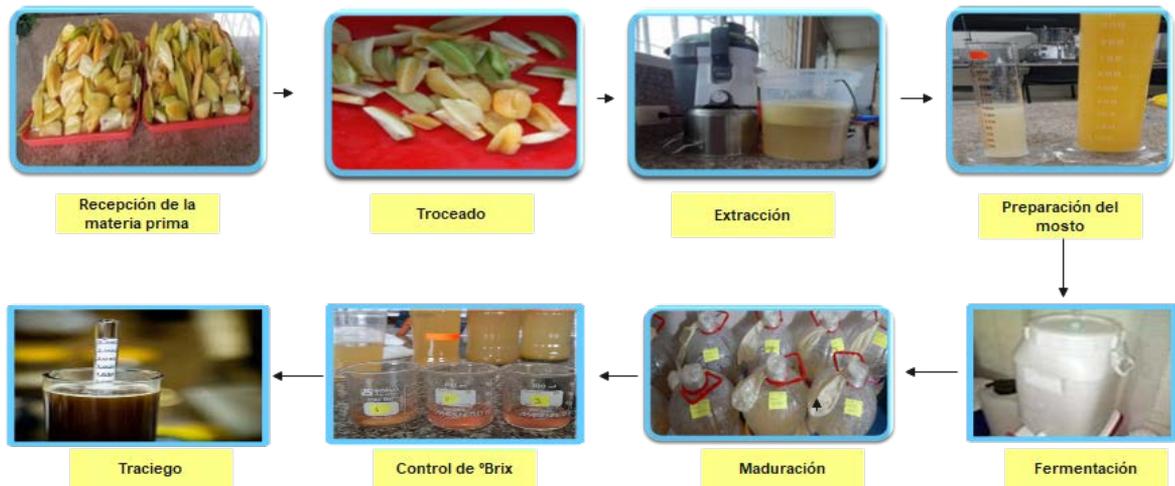
Tal y como se muestra en la tabla IV.2. se desarrollaron 8 unidades experimentales (UE) de las que se realizaron tres réplicas.

**Tabla IV.2.** Descripción de las unidades experimentales.

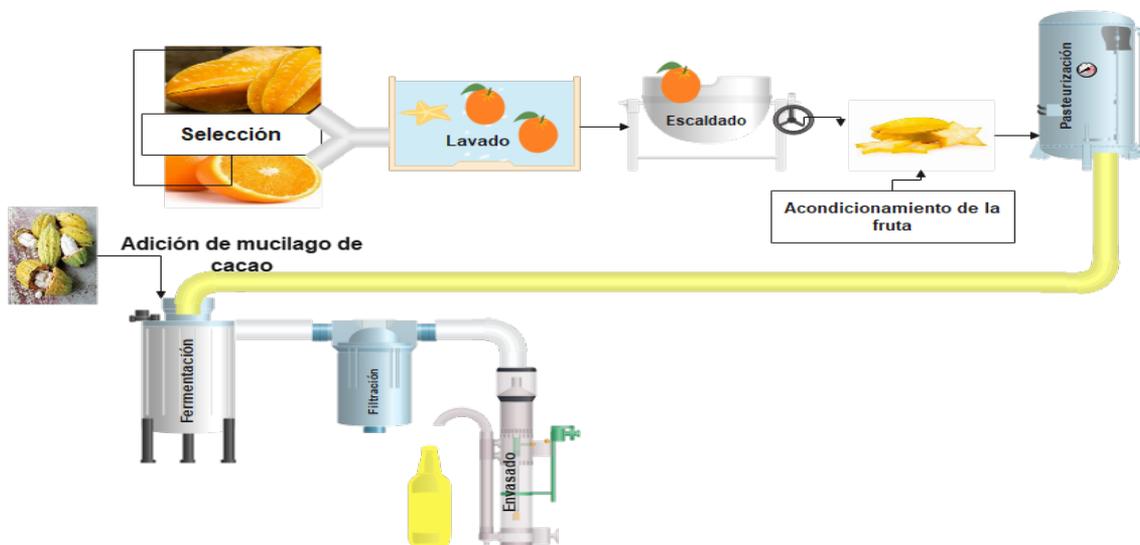
<b>Unidades Experimentales</b>	<b>Descripción</b>
1	Naranja + Concentración Mucílago 10% + CCN-51
2	Naranja + Concentración Mucílago 10% + Fino de aroma
3	Naranja + Concentración Mucílago 15% + CCN-51
4	Naranja + Concentración Mucílago 15% + Fino de aroma
5	Carambola + Concentración Mucílago 10% + CCN-51
6	Carambola + Concentración Mucílago 10% + Fino de aroma
7	Carambola + Concentración Mucílago 15% + CCN-51
8	Carambola + Concentración Mucílago 15% + Fino de aroma

En la siguiente figura se muestran las principales etapas que se desarrollaron para elaborar las bebidas fermentadas (Figura IV.6):

## Elaboración de bebidas fermentadas de naranja y carambola con adición de mucílago de cacao



## Uso de residuos de cacao (mucílago) para producir bebidas fermentadas



**Figura IV.6.** Imágenes de las principales etapas desarrolladas para elaborar las bebidas fermentadas de naranja y carambola.

Las etapas que se llevaron a cabo son las siguientes:

**Selección y limpieza:** Se seleccionaron frutos en buen estado, libres de alteraciones microbianas y daños mecánicos (cortes, golpes u otros). Se eliminaron impurezas como tierra, ramitas y hojas que pudieran contener los frutos.

**Pelado de la naranja:** Esta operación se realizó en naranjas para evitar que los aceites esenciales de la cáscara de naranja, de tal manera que pudieran acidificar los jugos. Esto puede bloquear el proceso de fermentación, lo que lleva a un sabor astringente.

**Acondicionamiento de la carambola:** Se picaron 25 kg de carambola en rodajas pequeñas para obtener el extracto de carambola. Fueron sumergido en ácido cítrico a una concentración del 0,02% durante 15 minutos para evitar la oxidación del fruto.

**Pasteurización:** Los extractos de naranja y carambola se obtuvieron con el uso de un extractor de jugos de frutas marca Oster FPSTJE316W (Estados Unidos). Posteriormente fueron pasteurizados a 65 °C durante 15 minutos en un sistema de mezclado alimentado con vapor para su calentamiento, en este sistema consta de un termómetro y válvulas de ingresos de vapor para controlar la presión de trabajo. Previo a la extracción se sumerge la fruta en agua con una temperatura de 90°C por un tiempo de 3 minutos y luego se disminuyó su temperatura drásticamente para que exista un choque térmico para eliminar todo tipo de microorganismos en los frutos.

**Elaboración del mosto:** En esta etapa se combina el extracto de carambola y/o naranja con un volumen de 2000 mL con cada uno de los porcentajes de mucilago establecidos en la investigación, para obtener una mejor fermentación se corrigió los grados Brix a 21 con la adición de sacarosa.

**Fermentación:** El mosto se colocó en un recipiente acondicionado. Para el proceso fermentativo se selló correctamente, y se colocó una válvula (Air lock CO<sub>2</sub>) para eliminar el CO<sub>2</sub> producido durante el proceso oxidativo de los azúcares. Cabe recalcar que no se aplicó ningún tipo de levadura comercial a este tipo de fermentación fue natural por contener levaduras propias del mucilago de cacao.

**Maduración:** El proceso de maduración es la etapa en la que adquiere una mayor intensidad de sus aromas y sabores. Este proceso duró 40 días a una temperatura de 24 ±3 °C sin la presencia de luz y con una humedad promedio de 70%. Cuanto mayor sea el tiempo de maduración, mayor es la intensidad de los sabores, aromas y color.

**Almacenamiento:** Se realizó un envasado en botellas de vidrio y posteriormente se almacenaron durante siete días en refrigeración a 4 °C cuya finalidad es evitar algún tipo de reactivación fermentativa, luego se colocó en perchas a temperatura ambiente con baja intensidad de luz.

#### **IV.2.3.2. Muestreo y análisis:**

Una vez finalizada la maduración de 40 días y transcurrido el periodo de almacenamiento se tomaron las muestras que fueron evaluadas en cuanto al pH, acidez titulable, sólidos solubles, sólidos suspendidos, transmitancia, absorbancia, y densidad. Además, se evaluó sensorialmente los atributos de color, olor, sabor, dulzor y astringencia. Los análisis se realizaron tal y como se describen en las secciones IV.5.

#### **IV.2.4. Elaboración de bebidas fermentadas a base de té con adición de mucílago de cacao**

Para desarrollar estas bebidas se utilizaron hojas de té verde y té negro, inóculo de Scoby, y mucílagos de cacao como se ha descrito en IV.2.2. Las materias primas como el mucilago de cacao se obtuvieron en las comercializadoras de cacao de Valencia (provincia de

Los Ríos), los dos tipos de té fueron adquiridos en despensas de la ciudad de Valencia de la marca Nature's Heart cada una en presentaciones de 20 gramos.

#### IV.2.4.1. Diseño experimental y etapas de la elaboración de las bebidas fermentadas de té

En la presente investigación se utilizó un modelo de diseño de bloques factorial (AxB). El factor A fue la concentración de mucílago de cacao (15, 20 y 30%), mientras que el factor B fueron los dos tipos de té utilizados para el proceso de elaboración de la bebida fermentada (té verde y té negro) (Tabla IV.3).

**Tabla IV.3.** Diseño de bloques factoriales (A\*B).

Unidades Experimentales	Descripción
1	15% mucílago + Té verde
2	15% mucílago + Té negro
3	20% mucílago + Té verde
4	20% mucílago + Té negro
5	30% mucílago + Té verde
6	30% mucílago + Té negro

Tal y como se muestra en la tabla IV.3. se desarrollaron 6 unidades experimentales (UE) con tres réplicas, lo que supone un total de 18 muestras.

El proceso de elaboración de la bebida fermentada de té con mucílago de cacao fermentado se describe en los siguientes pasos (Figura IV.7):



**Figura IV.7.** Esquema general de las etapas para la elaboración de bebida fermentada de té con adición de mucílago de cacao.

**Acondicionamiento de materiales:** El mucílago de cacao fue tamizado para eliminar impurezas, para luego ser envasado en recipientes de cristal, los envases de cristal deben estar esterilizados para prevenir alguna contaminación del producto.

**Preparación de las soluciones de té y pasteurización:** Se utilizaron tres gramos de té diluidos en 1000 mL de agua. La cocción se lleva a cabo a 100 °C durante 5 minutos, dando como resultado una solución concentrada y libre de microorganismos.

**Enfriamiento del té:** Esta operación permitió que la solución de agua y té reposara hasta que su temperatura descendiera aproximadamente 25 °C para la siguiente etapa que es el mezclado.

**Pasteurización del mucílago:** El mucílago de cacao se trató a 80 °C durante aproximadamente 5 minutos en un sistema de mezclado alimentado con vapor para su calentamiento, en este sistema consta de un termómetro y válvulas de ingresos de vapor para controlar la presión de trabajo de (8±3 PSI) y su temperatura controlada mediante termómetros (Figura IV.8).



**Figura IV.8.** Pasteurización del mucílago de cacao.

**Enfriamiento del mucílago:** En esta operación, el mucílago se deja reposar y enfriar hasta que descienda a 25°C, por debajo de la cual es posible mezclar.

**Mezcla y homogenización:** Una vez que el té y el mucílago alcanzaron los 25 °C, se colocaron las dos soluciones en el mismo recipiente. La mezcla se realizó muy lentamente para una correcta integración. Aquí se aplicó a la mezcla el porcentaje de mucílago de cacao según las unidades experimentales (15, 20 o 30%).

**Fermentación:** Luego se trasvasó el líquido en un recipiente de vidrio que contiene el SCOBY hasta que cubrió completamente el SCOBY. Luego, se selló con papel filtro o toallas absorbentes para la correcta intervención del oxígeno y gases emitidos durante el proceso. Se almacenaron en un ambiente seco, protegido de la luz y el calor. La fermentación tuvo lugar durante 7 días (Figura IV.9).



**Figura IV.9.** Imagen de la fermentación de la bebida a base de té con adición de mucílago de cacao.

**Tamizado:** En esta operación, se utilizó un tamiz metálico de 21 centímetros de diámetro y una altura de 6'5 centímetros, con agujeros de 0,5 milímetros para retener grumos visibles después de la fermentación causados por el Scoby y el mucílago de cacao.

**Envasado:** Después de siete días, el producto pasa por la etapa de filtración para lo cual se utilizó un proceso de microfiltración generando una barrera que evita el paso de micropartículas, conectado a un sistema eléctrico de envasado.

**Almacenamiento:** El almacenamiento se realiza bajo refrigeración 4 °C por un periodo de 8 días para disminuir la temperatura y detener el proceso de fermentación (o ralentizarlo significativamente).

#### **IV.2.4.2. Muestreo y análisis:**

Las fermentaciones fueron analizadas después del octavo día de almacenamiento evaluando el pH y acidez, turbidez, sólidos solubles, contenido de alcohol, densidad, absorbancia y transmitancia, recuentos de levaduras, *Salmonella* y *Escherichia coli*. Además, se evaluó sensorialmente los atributos de color, olor, sabor, dulzor y astringencia. Los análisis se realizaron tal y como se describen en las secciones IV.3.

#### **IV.2.5. Elaboración de cervezas artesanales con mucílago de cacao**

Para la elaboración de la cerveza artesanal tipo Ale con adición parcial de mucílago, este se adquirió de la finca “Voluntad de Dios” que se encuentra ubicada en el sector Fumisa, vía camarones, recinto Rio Chila, situado en la provincia de Los Ríos Oeste, con una altitud de 121 m, con clima tropical seco característico de la provincia de Los Ríos. Los lúpulos y la malta para la elaboración de la cerveza tipo Ale se obtuvieron de la empresa Beerland Store que se encuentra en la ciudad de Quito-Ecuador.

##### **IV.2.5.1. Diseño experimental y etapas de la elaboración de la cerveza artesanal con mucílago de cacao**

Para el diseño experimental se utilizó un diseño aleatorio, con arreglo factorial de A\*B\*C, cuyos factores fueron:

A= variedades de cacao (CCN-51 y Fino de aroma)

B= concentración de mucílago de cacao (20 % y 30 %)

C= tipo de lúpulo (Cascade y Northern Brewer)

Este diseño experimental corresponde a 10 unidades experimentales (UE) con tres réplicas, con un total de 30 unidades analíticas, como se presenta en la Tabla IV.4.

**Tabla IV.4.** Descripción de la composición de las unidades experimentales.

Unidad experimental	Descripción
1	Variedad CCN-51 + Concentración de mucílago 20 % + Lúpulo Cascade
2	Variedad CCN-51 + Concentración de mucílago 20 % + Lúpulo Northem brewer
3	Variedad CCN-51 + Concentración de mucílago 30 % + Lúpulo Cascade
4	Variedad CCN-51 + Concentración de mucílago 30 % + Lúpulo Northem brewer
5	Variedad Fino de aroma+ Concentración de mucílago 20 % + Lúpulo Cascade
6	Variedad Fino de aroma + Concentración de mucílago 20 % + Lúpulo Northem brewer
7	Variedad Fino de aroma + Concentración de mucílago 30 % + Lúpulo Cascade
8	Variedad Fino de aroma + Concentración de mucílago 30 % + Lúpulo Northem brewer
9	Sin mucílago + Lúpulo Cascade
10	Sin mucílago + Lúpulo Northem brewer

A continuación, se detallan las etapas que se siguieron para la elaboración de la cerveza (Figura IV.10):

### Elaboración de la cerveza con la adición de mucílago de cacao



**Figura IV.10.** Esquema de los procesos de la elaboración de cerveza artesanal con la inclusión de mucílago de cacao.

**Malteado:** Durante el malteado los granos de cereal, normalmente de cebada, atraviesan un proceso de germinación controlada con el fin de activar las enzimas presentes en el grano, que luego serán necesarias durante la maceración. Para la presente investigación la cebada se adquirió ya malteada.

**Molienda:** El molido del grano se efectuó con la ruptura del pericarpio de la malta de cebada en un molino eléctrico (Marca Victoria, adaptado a un motor eléctrico de 1 hp de potencia; Figura IV.11), esta acción permite extraer con mayor facilidad los azúcares que contiene la malta.



**Figura IV.11.** Imagen del proceso de molienda de la malta de cebada.

**Maceración y filtrado:** Una vez molido el grano de cereal, se mezcló con agua para preparar el mosto cervecero cuya proporción es por cada kilogramo de malta se aplica 4,85 litros de agua. La temperatura se incrementa gradualmente, logrando extraer las enzimas y azúcares que posee la malta. Se inició con 40 °C al realizar la mezcla y se pone a calentar para activar las enzimas aromáticas en torno a los 50 °C. La malta molida, a partir de los 75 °C, desencadena por hidrólisis la producción de los azúcares, la maltosa y las dextrinas, transformando el almidón que contenga esa malta (Figura IV.12). Finalizada la maceración se llevó a cabo la filtración del mosto, en la que se separó el mosto de los restos de malta. Para ello se filtró el mosto a través de un filtro prensa de la marca Perfection performance Innovation (Plants India) el cual posee una capacidad de 20 litros.



**Figura IV.12.** Imagen del proceso de maceración de la malta de cebada.

**Cocción:** En este proceso se incrementó la temperatura a 80°C al mosto (20 litros) por un tiempo de 60 minutos, con el objetivo de esterilizar el mosto e inactivar las enzimas de la malta. Debido a que se utilizaron 2 lúpulos, el mosto se dividió en 2 recipientes metálicos, se agregaron 60 g de lúpulo Cascade en el primer recipiente metálico y en el segundo recipiente metálico se agregó la misma cantidad de lúpulo Northern Brewer. Este proceso se llevó a cabo agregando cada lúpulo en dos etapas, en las que se agregaron 30 g al mosto, y después de 15

minutos se aplicó el lúpulo restante al mosto con agitación constante para que se produzca la cocción del lúpulo.

**Enfriamiento del mosto:** En el enfriamiento del mosto se redujo la temperatura a 33 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se inoculó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ale) en una cantidad de 5,75 g para 20 litros de mosto. También se agregó un agente clarificante (selafine) en proporción de 1 g para los 20 L de mosto.

**Fermentación:** Tras la adición de la levadura, la fermentación tuvo lugar durante dos semanas a una temperatura de 26 °C, pero esta temperatura depende de la cepa de levadura a utilizar. Durante la fermentación no se permitió que la luz influyese en la fermentación y para ello los recipientes se cubrieron con una película negra por un tiempo de 15 días. Para la liberación de los gases se colocaron válvulas Air Lock CO<sub>2</sub> en los fermentadores.

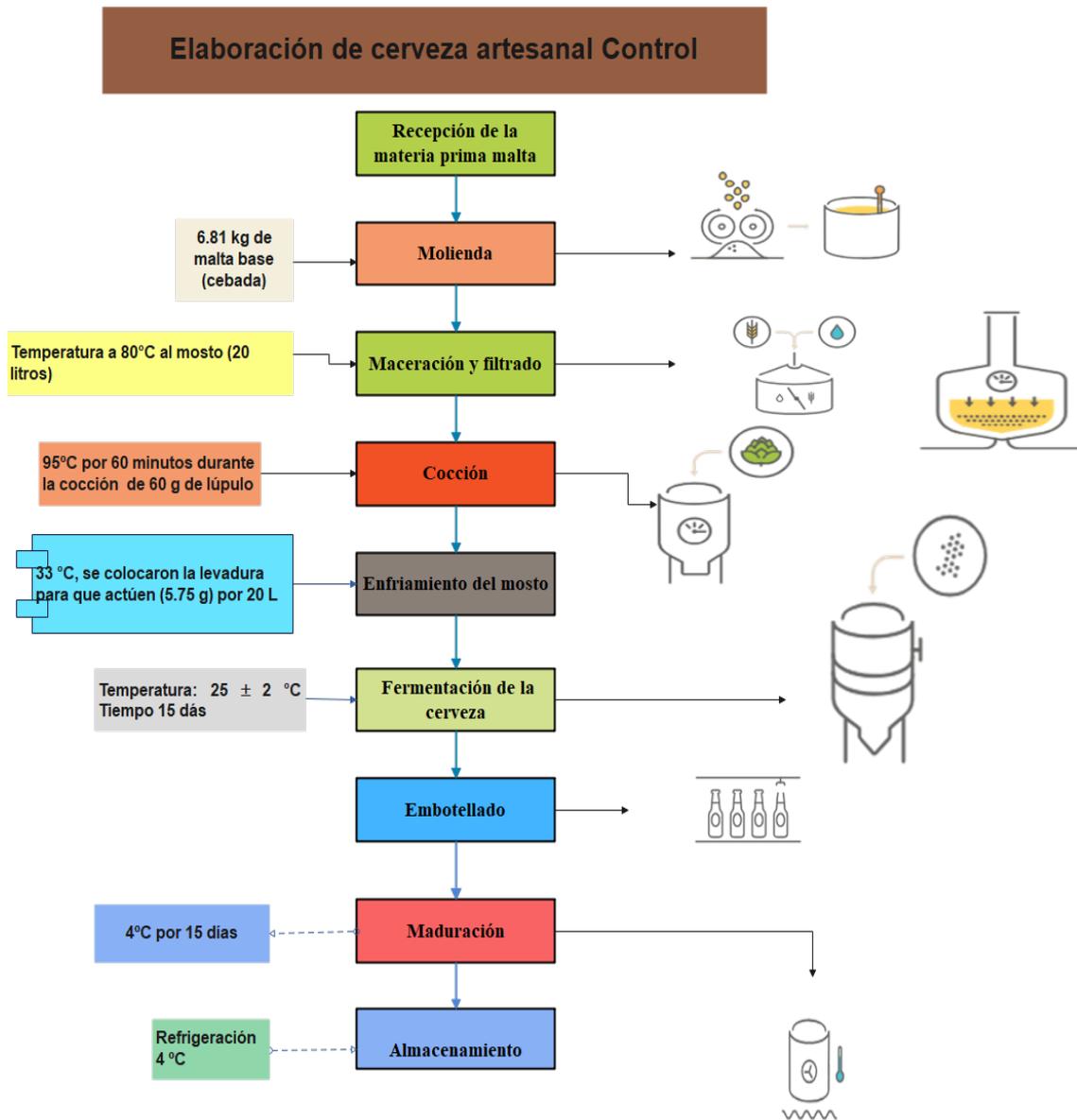
En el caso de las muestras en las que se incluyó el mucílago del cacao, esta adición se realizó en porcentajes del 20%, que equivale a 600 mL, y 30%, que equivale a 900 mL, de mucílago de cacao en recipientes polietileno con una capacidad de 5 litros para cada una de las variedades, completando con el mosto 3 litros en cada uno de los tratamientos.

**Embotellado:** La cerveza se envasó en botellas de cristal de 330 cc. Para conservar el ácido carbónico en la cerveza, el llenado se realizó mediante un dispensador de líquidos automático recargable, de marca Shopily, asegurando así la calidad de la cerveza.

**Maduración:** El líquido envasado requiere de un período de maduración de 15 días, la cerveza puede madurarse a 22°C o 4°C. Para evitar algún tipo de activación fermentativa se trabajó a 4 °C para que el sabor y los aromas logrados durante el proceso se estabilicen y se consiga el justo balance entre los diferentes matices.

**Almacenamiento:** Finalmente, la cerveza artesanal se almacenó en refrigeración a una temperatura de 4 °C durante un periodo de 6 días.

El siguiente diagrama (Figura IV.13) muestra todas las etapas descritas anteriormente.



**Figura IV.13.** Diagrama de flujo de la elaboración de cerveza artesanal.

#### IV.2.5.2. Muestreo y análisis:

Las muestras se tomaron tras 15 días de almacenamiento de las cervezas. Las fermentaciones fueron analizadas evaluando el pH y la acidez, la turbidez, sólidos en suspensión, sólidos solubles, contenido en alcohol, densidad, colorimetría, absorbancia y transmitancia, grado de amargor, cantidad de espuma, recuentos de aerobios mesófilos, *Salmonella* y *Escherichia coli*. Además, se evaluó sensorialmente los atributos de color, olor, sabor, dulzor y astringencia. Los análisis se realizaron tal y como se describen en las secciones IV.3.

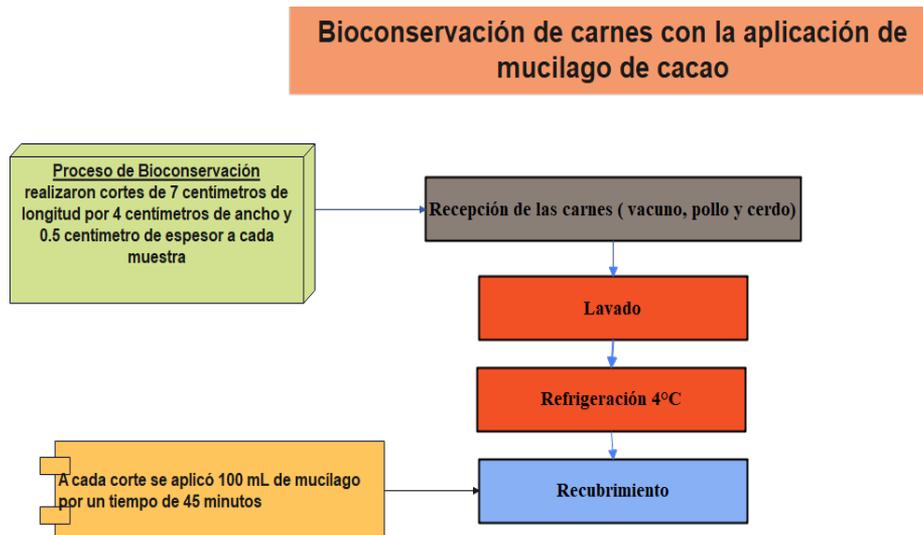
## IV.2.6. Bioconservación de carne mediante mucílago de cacao

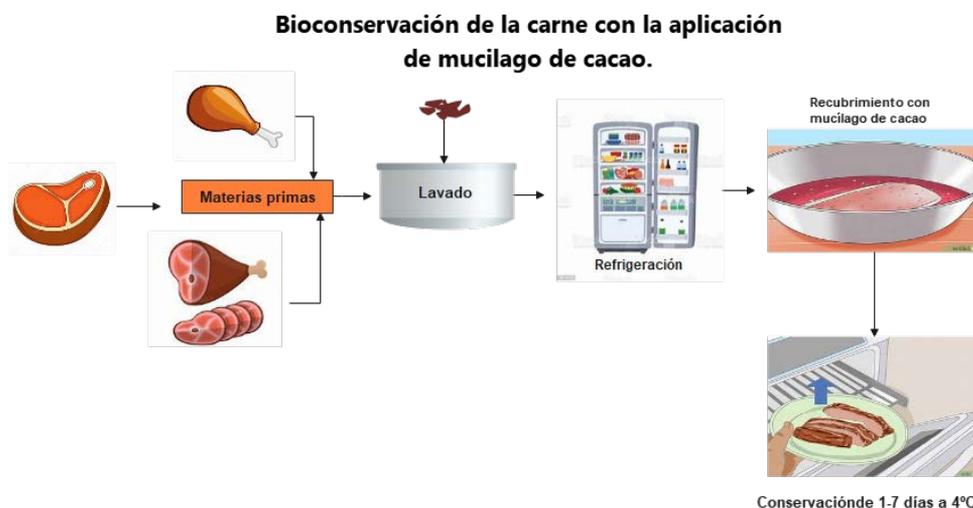
Para este trabajo se utilizaron carnes de cerdo, pollo y ternera, obtenidas de supermercados locales de la región del cantón Quevedo (Ecuador). Los cerdos faenados tenían una edad de 4 a 6 meses de engorde a esto se suma las cerdas de descarte o que ya no se utilizan para reproducción con una edad de 2 a 4 años. Dentro de las razas que se faenan en la ciudad tenemos: Pietrain, Landrace, Hampshire criados con fórmulas de crecimiento y engorde, además de eso con la adición de residuos vegetales. Según la información disponible, la carne de pollo utilizada provenía de animales cuyas edades se encuentran entre la sexta y séptima semana. Dentro de las razas que se consumen en el medio son: Broiler y Orpington. Finalmente, las edades de los vacunos oscilaron desde 1,5 a 6 años. Las razas que se faenan en el camal de la ciudad son: Brahman, Holstein-Friesian, Gyr, Brown Swiss y mestizos, trasportados desde los sectores aledaños al Cantón Quevedo.

Asimismo, se utilizó mucilago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de aroma que se obtuvo de la finca ubicada en el km 29 de la vía Buena Fe - Santo Domingo.

### IV.2.6.1. Diseño experimental y etapas de la preparación de las muestras de carne con mucílago de cacao

En la figura IV.14. se muestran las principales etapas realizadas para el diseño del experimento de bioconservación de carnes con mucílago de cacao





**Figura IV.14.** Descripción del proceso de conservación de las carnes de cerdo, pollo y ternera mediante la aplicación de mucílago de cacao.

A continuación, se detallan las principales operaciones realizadas para conservación de carnes:

**Recepción:** Las carnes (cerdo, pollo y ternera) fueron seleccionadas, pesadas y lavadas para eliminar cualquier impureza tomando en consideración un mismo lugar de extracción como la parte del musculo que contiene las extremidades.

En el caso de la carne de cerdo se obtuvo la carne magra. En concreto, se trabajó con la parte superior de la pierna trasera del cerdo, esta pieza entera suele destinarse a la elaboración del jamón curado.

Para la carne de pollo se tomó del muslito o jamoncito de pollo (están situados en la parte inferior de la pata por debajo de la articulación de la rodilla).

Con lo referente a la carne de ternera se tomó la contratapa. La contratapa es una pieza localizada en la parte exterior del muslo, perteneciente al despiece del cuarto trasero.

**Lavado:** Inmediatamente después las carnes fueron lavadas con abundante agua con 30 ppm de hipoclorito sódico, con el fin de eliminar cualquier tipo de impureza.

**Preparación de las piezas y refrigeración:** Justo a continuación de lavar las carnes, inició el proceso de pesado de las muestras para separar los experimentos de estudio, cada muestra tuvo un peso 250 gramos. Todos los cortes de cada especie fueron refrigerados a una temperatura de 4 °C durante un periodo de 24 horas para eliminar la sangre y agua que aún contiene después de ser faenados. Se colocaron los cortes sobre almohadillas absorbentes para evitar la proliferación de microorganismos.

**Recubrimiento:** Una vez transcurridos las 24 horas se realizaron cortes de 7 centímetros de longitud por 4 centímetros de ancho y 0,5 centímetro de espesor a cada muestra, con un total de 36 cortes. A cada corte se aplicó 100 mL de mucílago por un tiempo de 45 minutos. Posterior a esto, se llevó a refrigeración a 4 °C por un periodo de 1 y 7 días. Como controles, se utilizaron piezas sin recubrimiento (Figura IV.15).



**Figura IV.15.** Recubrimiento con mucílago de cacao para conservación de las carnes.

En base a esta descripción, con tres tipos de carnes a los que se aplicaron 2 tipos de mucílagos, se evaluaron a los tiempos de conservación de 1 y 7 días y se obtuvieron 3 réplicas de cada tratamiento, se analizaron un total de 54 unidades de carne.

#### **IV.2.6.2. Muestreo y análisis:**

Los análisis se realizaron a los 1 y 7 días de conservación en refrigeración. Las piezas cárnicas fueron analizadas evaluando el pH y la acidez, humedad, capacidad de retención de agua, colorimetría, textura. Además, se realizaron análisis microbiológicos de mohos y levaduras, coliformes totales, y bacterias ácido-lácticas. Los análisis se realizaron tal y como se describen en las secciones IV.3.

### **IV.3. Análisis**

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **IV.3.1. Determinación de parámetros fisicoquímicos**

##### **IV.3.1.1. Determinación del pH para líquidos**

La determinación del pH se realizó siguiendo las normas ecuatorianas. Para ello se utilizó un pH metro de la marca y modelo OHAUS modelo STARTER 5000.

Se siguió el método definido por la Norma INEN-ISO 2917: 2013 (Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), 2013). Para el caso de los líquidos se realizó directamente la toma ingresando el electrodo al vaso de precipitación que se encuentra 10 mL de la muestra.

##### ***IV.3.1.1.1. Determinación del pH para sólidos***

La determinación del pH de las carnes se realizó pesando 10 g de la muestra en una balanza marca ACCULAB modelo VIC-612, previamente triturada en un macerador y puesta en un vaso de precipitación de 50 mL. Se añadieron 10 mL de agua destilada y se agitó durante 1 minuto. Transcurrido ese periodo de tiempo el pH se registró en un potenciómetro de la marca OHAUS modelo STARTER 5000.

### IV.3.1.2. Determinación de la acidez titulable para líquidos

La determinación de acidez (%) se realizó por el método 947.0 de la AOAC (“AOAC Official Method 947.05 Acidity of Milk,” 2000). Este método consiste en la titulación de 10 mL de muestra con 0,1 N NaOH y utilizando fenolftaleína como indicador.

#### IV.3.1.2.1. Determinación de la acidez titulable para sólidos

En el caso de la carne, se pesaron 10 g de carne triturada en una balanza marca ACCULAB, modelo VIC-612; colocando en un vaso de precipitación junto con 100 mL de agua destilada homogeneizando por 1 minuto. Se filtró en manta de cielo, y se colocó el líquido filtrado en un matraz de 250 mL, para luego ser aforado con agua destilada. Se colocaron 25 mL de la solución aforada en un matraz Erlenmeyer de 150 mL, añadiendo 75 mL de agua destilada y 2 gotas de fenolftaleína, para seguidamente agitar suavemente. Después se procedió a titular con NaOH 0,01 N. Los resultados se expresaron en porcentaje de ácido láctico con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{0,1 * V_{NaOH} * 0,09}{P_m} * 100 \quad (1)$$

- V NaOH = volumen gastado de hidróxido de sodio 0,1 N
- P<sub>m</sub> = peso de muestra
- Factor 0,09 = peso equivalente del ácido láctico

#### IV.3.1.3. Determinación del contenido en sólidos en suspensión

Se tomó 1 mL de muestra en un tubo Eppendorf, y luego se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm en una centrífuga (Microcentrífuga Spectrafuge™24D, USA - Nueva Jersey). Antes de la centrifugación se tomó el peso de la muestra en una balanza analítica (BOECO, modelo BAS 31 plus, Alemania). Tras la centrifugación y la eliminación del sobrenadante, los eppendorf se pesaron nuevamente para obtener el valor final (%) de los sólidos aglomerados por efecto de la centrifugación Norma mexicana (NMX-AA-034, 2015).

#### IV.3.1.4. Determinación del contenido de sólidos solubles totales

Se utilizó un refractómetro electrónico (marca ATAGO). Las mediciones se realizaron a una temperatura de aproximadamente 25 °C. Se colocaron de 1 a 2 gotas de la muestra en el diafragma del equipo. Este dispositivo tiene una escala de 0 a 100 °Brix. (AOAC Official Method, 2012).

#### IV.3.1.5. Determinación del contenido de humedad

Las muestras procesadas se determinaron mediante el método del horno cuya marca fue MEMMERT modelo TV-400 serie A 4930974. Se pesaron 3 g de muestra en crisoles de peso conocido. Los crisoles con las muestras se colocaron en un horno operado a 105 °C durante 3 horas. Se llevó a cabo por el método gravimétrico descrito por (León, 2018).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_1 + P_2) - P_3}{P_2} * 100 \quad (3)$$

- P<sub>1</sub> = Peso de la placa (g)
- P<sub>2</sub> = Peso de la muestra (g)

- P3 = Peso de la placa + Peso de la muestra

#### **IV.3.1.6. Determinación del grado alcohólico**

Para la determinación del grado alcohólico se utilizaron 90 mL en el caso de la producción de bioetanol, y 150 mL en el resto de los ensayos. Luego se introdujo el alcoholímetro Gay Lussac (°GL), que le permitió flotar para obtener los resultados del análisis según la Norma INEN 340 Bebidas alcohólicas (NTE340, 1994).

#### **IV.3.1.7. Determinación de densidad**

Para determinar la densidad, en primer lugar, se pesó el picnómetro limpio y seco con aproximación al 0,1 mg en una balanza (BOECO, modelo BAS 31 PLUS, Alemania). Posteriormente se realizó el llenado del picnómetro con la muestra, y se pesó. Finalmente se vació el picnómetro y limpió; se secó interiormente con una corriente de aire seco y se llenó de agua destilada hasta la marca respectiva, evitando la formación de burbujas de aire. Nuevamente se obtuvo la pesada con agua destilada, con aproximación al 0,1 mg. Se determine según la norma NTE 349 en unidades de g/cm<sup>3</sup> (INEN349, 1978) aplicando la fórmula:

$$d = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1} \quad (4)$$

$d$  = densidad relativa g/cm<sup>3</sup>

$m_1$  = masa del picnómetro vacío, en gramos.

$m_2$  = masa del picnómetro con la muestra, en gramos.

$m_3$  = masa del picnómetro con agua destilada, en gramos.

#### **IV.3.1.8. Determinación de la turbidez**

El equipo de turbidímetro 2100 AN de la marca Hach procedencia de Estados Unidos fue calibrado previamente. Este equipo mide la intensidad de la luz dispersada a 90 grados cuando un rayo de luz pasa a través de la muestra. Se colocaron en cubos de vidrio de 30 mL de muestra y se cerró con los tapones. Las muestras se colocaron en el soporte del turbidímetro, se esperó un tiempo de 15 minutos para observar la lectura de los análisis realizados en unidades NTU/FNU (Unidad de turbidez nefelométrica; (HACH, 2020).

#### **IV.3.1.9. Determinación del calor específico**

Se determinó mediante una Bomba Calorímetro "TBCF", T213-2008, modelo BLS-384. El incremento de temperatura es de acuerdo con el calor de cada muestra la cual se mueve constantemente con un agitador, y luego la solución reacciona a 6 voltios y 1 amperio. Los resultados se expresaron en kJ/Kg °C.

#### **IV.3.1.10. Determinación de la potencia de combustión**

Este análisis se realizó combinando etanol con gasolina y probando en un motor de combustión Datsun 1200 (motor A12 de 1,0 litros (988 cc) durante 60 minutos en una proporción de 10% de bioetanol y 90% de gasolina comercial, 5% de bioetanol y 95% de gasolina comercial.

#### IV.3.1.11. Determinación de la transmitancia y absorbancia

Se analizaron 2 mL de muestra para esta determinación. Se utilizó un espectrofotómetro DR3900 HACH serie 1488262, con una longitud de onda de 430 nanómetros. Se aplica la ley de Beer-Lambert para la absorción que relaciona la intensidad a la salida de la muestra  $I_f$ , con la intensidad inicial  $I_0$ , la concentración de moléculas y la distancia recorrida por la luz en la muestra mediante el método de absorción.

#### IV.3.1.11. Análisis del color

La medición del color se realizó siguiendo las recomendaciones dadas por la American Meat Science Association ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), método CIELab (Ripoll et al., 2012). Se utilizó un colorímetro marca CHROMA METER CR 400, determinando los siguientes parámetros:

- $L^*$  define la luminosidad
- $a^*$  componente de color rojo-verde
- $b^*$  componente de color amarillo-azul

La diferencia entre medir el color de la carne y el color de las fue la preparación de la muestra. La carne fue cortada en rodajas finas para que la luz pueda penetrar fácilmente en la muestra. La cerveza, por otro lado, fue vertida en un vaso para que el colorímetro pueda medir el color de la superficie de la cerveza.

La conversión de las coordenadas Cielab a color se realizaron mediante la aplicación gratuita disponible en: <https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>.

#### IV.3.1.12. Determinación de la cantidad de espuma

Adaptado el principio "NIBEM" se determinó la estabilidad de la espuma, vertiendo en una probeta 300 mL de cerveza. Ya estabilizada la espuma mide el tiempo en que se mantiene y desaparece. El método "NIBEM" mide el colapso de la espuma creada en el vertido de la botella en el vaso (Sánchez et al., 2016).

#### IV.3.1.13. Determinación del grado de amargor

El grado de amargor se determinó por el método de IBU (International Bitterness Unit) (Calado et al., 2019) mide en unidades internacionales de amargor (IBU), que son una medida de la cantidad de isohumulones, un tipo de alfa ácido del lúpulo, presentes en la cerveza. Los isohumulones son responsables del sabor amargo de la cerveza para lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$IBU = \frac{W_h * \%AA * U_{aa}}{V_w * 1,34} \quad (5)$$

$W_h$ = porcentaje de lúpulo.

$\%AA$ = porcentaje de ácidos alfa.

$U_{aa}$ = Cuantos ácidos alfa son usados en el proceso de hervido.

$V_w$ = volumen de mosto.

#### IV.3.1.14. Determinación de la capacidad de retención de agua

Para calcular la capacidad de retención de agua (CRA) de las carnes se utilizó el método de presión en papel de filtro (López & Segovia, 2015). El cálculo de la CRA (%) se realizó mediante la fórmula:

**Formula:**

$$CRA \left( \frac{g H_2O \text{ retenida}}{100 g H_2O} \right) = \frac{(m_1 * H) - (m_2 - m_3)}{m_1 * H} * 100 \quad (6)$$

- m1 = masa de la muestra (g).
- m2 = masa del papel de filtro húmedo (g).
- m3 = masa del papel de filtro seco (g).

#### IV.3.1.15. Determinación de la textura

Se utilizó el método de compresión y punción para medir propiedades de textura en alimentos. Se colocó la muestra en el Texturómetro SHIMADZU que es operado por el software TRAPEZIUM versión 1.4.0. Los valores son registrados en Newtons después de que se aplicará una sonda de compresión (Carvajal, 2008).

#### IV.3.2. Análisis microbiológicos

Para la detección y conteo de diferentes tipos de microorganismos en las bebidas fermentadas de frutas, la bebida fermentada de té, cerveza y carnes frescas el procedimiento seguido fue el siguiente:

Para el desarrollo de las diluciones decimales se tomaron asépticamente volúmenes de 10 mL en el caso de los alimentos líquidos y se pesaron 10 g de las carnes. Estas muestras fueron mezcladas con 90 mL de agua de peptona y homogenizados convenientemente durante 2 minutos. Posteriormente se realizaron las subsecuentes diluciones decimales mediante el pipeteo de 1 mL de las diluciones anteriores en 9 mL de agua de peptona. Entre dilución y dilución las soluciones fueron homogenizadas mediante agitación en un Vortex (Labnet modelo S0200-230V-Estados Unidos) durante 1 minuto.

Todos los medios de cultivo fueron disueltos mediante agitadores calentadores magnéticos con agitación constante siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los medios agarizados, una vez llevados a ebullición, y los medios sólidos, fueron esterilizados en una autoclave marca K GEMMY aplicando un tratamiento de 121°C durante 15 minutos.

Para la determinación de los microorganismos aerobios totales se utilizaron placas de Agar Nutriente de la marca Britania adquirido en Argentina como medio de cultivo, incubando las placas a 30°C durante 48 horas.

Para la determinación de los coliformes se utilizó el medio de cultivo Gelose VRBL, Agar BK152HA de la marca Scharlau Microbiología (España), incubando las placas a 37°C durante 48 horas.

La detección y cuantificación de *Escherichia coli* se realizó mediante Agar MacConkey de la marca Britania adquirido en Argentina, incubando las placas a 37°C durante 48 horas.

Para la determinación de *Salmonella* sp. se utilizó el medio Salmonella Shigella Agar de la marca Britania adquirido en Argentina, incubando las placas a 37°C durante 48 horas.

La cuantificación de mohos y levaduras se realizó mediante la siembra en Potato Dextrose Agar de la marca Scharlau Microbiología (España), como medio de cultivo, incubando las placas a 25°C durante 5 días.

Las bacterias ácido-lácticas se cuantificaron mediante MRS Agar de la marca Britania adquirido en Argentina, incubando en placas a 30°C durante 48 horas.

En la tabla IV.5 se detalla los microorganismos detectados, el medio de cultivo utilizado y que método que se siguió.

**Tabla IV.5.** Análisis microbiológicos realizados, medios de cultivo empleados y método seguido.

<b>Microorganismo</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Método</b>
<b>Mohos y levaduras Aerobios</b>	Potato Dextrose Agar Agar Nutriente	(INEN 767, 1985) (Amazará, 2022) (ISO4833, 2013)
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey	(INEN-2667, 2013) e (INEN 765, 2013)
<b>Salmonella</b>	Salmonella Shigella Agar	(INEN-1529-15, 2009) (NTE INEN 2802, 2015)
<b>Coliformes totales</b>	Gelose VRBL, Agar BK152HA	INEN 1529-8
<b>Bacterias Ácido- Lácticas</b>	M.R.S. Agar	ISO 15214 (1998)

Para el conteo de los microorganismos se seleccionaron placas con aproximadamente 30-300 colonias. Los resultados se expresaron en log ufc/g o mL.

### **IV.3.3. Análisis sensorial**

#### **IV.3.3.1. Bebidas fermentadas de naranja y carambola con adición de mucílago de cacao**

Las características y análisis organolépticos de las bebidas fermentadas se determinaron usando una escala de 5 puntos para color, olor, sabor, dulzor y astringencia. (1=no me gusta mucho, 2=no me gusta, 3=neutral, 4=me gusta, 5=me gusta mucho). La prueba del producto fue realizada por una selección de 10 catadores no entrenados entre 20 y 25 años seleccionados entre los estudiantes de las Universidad Estatal de Quevedo (Ecuador). Cada panelista recibió tres muestras con un volumen de 30 mL, codificadas mediante tres dígitos aleatorios. Se instruyó a los panelistas para que limpiaran sus paladares con agua antes y entre cada muestra.

#### **IV.3.3.2. Bebidas fermentadas de té con adición de mucílago de cacao**

Las características y análisis organolépticos de las bebidas fermentadas de té se determinaron usando una escala de 10 puntos para color, olor, sabor, dulzor y astringencia. (2 puntos = no me gusta mucho, 4 = me gusta poco, 6 = neutral, 8 = me gusta y 10 = me gusta mucho.). La prueba del producto fue realizada por una selección de 18 catadores no entrenados entre 25 y 45 años seleccionados entre los trabajadores y los estudiantes de las Universidad Estatal de Quevedo (Ecuador). Cada panelista recibió cinco muestras diferentes, con un volumen de 20 mL, codificadas mediante tres dígitos aleatorios. Se instruyó a los panelistas para que limpiaran sus paladares con agua antes y entre cada muestra.

#### **IV.3.3.3. Cerveza artesanal con adición de mucílago de cacao**

Las características y análisis organolépticos de las cervezas artesanales se determinaron usando una escala de 5 puntos para color, olor, sabor, dulzor y astringencia. (1=no me gusta mucho, 2=no me gusta, 3=neutral, 4=me gusta, 5=me gusta mucho). La prueba del producto fue realizada por una selección de 18 catadores no entrenados entre 30 y 45 años seleccionados entre los trabajadores de la Universidad Estatal de Quevedo (Ecuador). Cada panelista recibió cinco muestras diferentes, con un volumen de 20 mL, codificadas mediante tres dígitos aleatorios. Se instruyó a los panelistas para que limpiaran sus paladares con agua antes y entre cada muestra.

A continuación, se muestra como ejemplo la ficha para el análisis sensorial entregada a los panelistas.

## FICHA SENSORIAL -ORGANOLÉPTICA DE CERVEZA

**Evaluador:**

**Fecha:**

**Indicaciones:**

A continuación, se dispone de muestras cerveza artesanal tipo Ale con mucílago de cacao en combinación con lúpulo Cascade y Northern Brewer, las cuales deberán ser catadas por personas aptas y bebiendo agua después de cada evaluación.

*Marque con una "X" la calificación que el parezca, según las características solicitadas. 1. Me disgusta mucho, 2. Me disgusta poco, 3. Neutral, 4. Me gusta poco, 5. Me gusta mucho*

Componente sensorial	Características	Selección
Apariencia	1. Me disgusta mucho	
	2. Me disgusta poco	
	3. neutral	
	4. Me gusta poco	
	5. Me gusta mucho	
Aroma	1. Me disgusta mucho	
	2. Me disgusta poco	
	3. neutral	
	4. Me gusta poco	
	5. Me gusta mucho	
Sabor	1. Me disgusta mucho	
	2. Me disgusta poco	
	3. neutral	
	4. Me gusta poco	
	5. Me gusta mucho	
Sensación en la boca	1. Me disgusta mucho	
	2. Me disgusta poco	
	3. neutral	
	4. Me gusta poco	
	5. Me gusta mucho	

### IV.3.4. Tratamiento estadístico

#### IV.3.4.1. Caracterización del mucílago de cacao

Los resultados obtenidos de las analíticas de pH, % acidez, sólidos solubles totales, turbidez, densidad, espacio CIElab (L\*, a\*, y b\*), absorbancia y transmitancia se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) en base a los factores variedad de cacao. En caso de encontrar medias con diferencias significativas, estas fueron separadas por el test de Tukey ( $p < 0,050$ ).

#### IV.3.4.2. Producción de bioetanol a partir de residuos de cacao

Los resultados obtenidos de las analíticas de turbidez, densidad, calor específico, producción de bioetanol, pH, sólidos totales, acidez y grados alcohólicos se analizaron mediante

el análisis de la varianza (ANOVA) en base a los factores variedad de cacao, tipo de residuo y nivel de inoculación de levadura. En caso de encontrar medias con diferencias significativas, estas fueron separadas por el test de Tukey ( $p < 0,050$ ).

#### **IV.3.4.3. Elaboración de bebidas fermentadas de naranja y carambola con adición de mucílago de cacao**

Los resultados obtenidos de las analíticas de pH, acidez titulable, sólidos solubles, sólidos suspendidos, transmitancia y absorbancia, y densidad y los parámetros sensoriales se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) en base a los factores variedad de cacao, concentración de mucílago y tipo de fruta. En caso de encontrar medias con diferencias significativas, estas fueron separadas por el test de Tukey ( $p < 0,050$ ).

#### **IV.3.4.4. Elaboración de bebidas fermentadas a base de té con adición de mucílago de cacao**

Los resultados obtenidos de las analíticas de pH y la acidez, la turbidez, sólidos solubles, contenido en alcohol, densidad, absorbancia y transmitancia, recuentos de levaduras, *Salmonella* y *Escherichia coli*, y los parámetros sensoriales se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) en base a los factores variedad de cacao, concentración de mucílago y tipo de té. En caso de encontrar medias con diferencias significativas, estas fueron separadas por el test de Tukey ( $p < 0,050$ ).

#### **IV.3.4.5. Elaboración de cervezas artesanales con mucílago de cacao**

Los resultados obtenidos de las analíticas pH y la acidez, la turbidez, sólidos en suspensión, sólidos solubles, contenido en alcohol, densidad, colorimetría, absorbancia y transmitancia, grado de amargor, cantidad de espuma, recuentos de totales, *Salmonella* y *Escherichia coli*, y los parámetros sensoriales se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) en base a los factores variedad de cacao, concentración de mucílago y tipo de lúpulo. En caso de encontrar medias con diferencias significativas, estas fueron separadas por el test de Tukey ( $p < 0,050$ ).

#### **IV.3.4.6. Bioconservación de la carne mediante mucílago de cacao**

Los resultados obtenidos de las analíticas de pH y la acidez, humedad, capacidad de retención de agua, colorimetría, textura, recuentos de mohos y levaduras, coliformes totales, y bacterias ácido-lácticas se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) en base a los factores variedad de cacao, tipo de carne y días de almacenamiento. En caso de encontrar medias con diferencias significativas, estas fueron separadas por el test de Tukey ( $p < 0,050$ ).

## **V. Resultados y Discusión**

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Caracterización del mucílago de cacao

En cuanto a las determinaciones fisicoquímicas del mucílago de cacao, recogidas en la Tabla V.1, se puede observar que el mucílago Fino de Aroma presentó valores ligeramente superiores de pH (pH 4,31) que el mucílago CCN-51 (pH de 4,11). Estas diferencias en el pH estaban asociadas al porcentaje de acidez, en el que el mucílago Fino de Aroma presentó valores de 0,68% mientras que CCN-51 presentó valores medios de acidez de 1,09%.

Respecto al contenido en sólidos solubles, el mucílago Fino de Aroma presentó mayores valores de sólidos solubles totales (15,50°Brix) que el CCN-51 (11,30 °Brix), que se asociaron con la turbidez, en la que el mucílago Fino de Aroma presentó valores superiores. Por el contrario, los sólidos en suspensión fueron 0,01 y 0,04 para los mucílagos Fino de Aroma y CC-51, respectivamente. Respecto a la densidad, se observaron valores superiores en el mucílago CCN-51 con valores de 1,49 g/L que Fino de Aroma con 1,08 g/L. y turbidez con un valor inferior de 9,34. Respecto a los parámetros ópticos, el mucílago Fino de Aroma fue más luminoso ( $L^*$ ) y con coloraciones más amarillas ( $b^*$ ), presentando valores bajos de transmitancia y absorbancia. Así, este mucílago presentó una tonalidad ambar clara. Por su parte, el mucílago CCN-51 presentó una coloración más rojiza y menos luminosa, presentando valores superiores de transmitancia y absorbancia. La tonalidad del mucílago CCN-51 fue ambar oscura. En la revisión realizada por Guirlanda et al. (2021) sobre las características de la “miel de cacao”, se observan que los resultados obtenidos de pH, acidez y sólidos solubles totales se encuentran dentro de los parámetros obtenidos en trabajos previos. Así, los valores de pH observados previamente se encuentran entre 2,76 y 4,89 (Villagómez & Moreta; 2013; Pisco-Caldas, 2009). Se ha observado un porcentaje de acidez entre 0,36 y 1,08 (Pisco-Caldas, 2009; Sosa & Manaday, 2018); mientras que los sólidos solubles totales se han situado en el rango de 13,3 y 19,6 °Brix (Balladares et al., 2016; Leite et al., 2019). En general, se puede afirmar que los valores obtenidos en el presente trabajo están dentro de los parámetros observados en la revisión realizada por Guirlanda et al. (2021).

Tabla V.1. Análisis fisicoquímicos del mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de aroma.

<b>Mucilago de Cacao</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez Titulable (%)</b>	<b>°Brix</b>	<b>Densidad (g/L)</b>	<b>NTU Turbidez</b>	<b>Sólidos en suspensión</b>	<b>Colorimetría <math>L^*</math></b>	<b>Colorimetría <math>a^*</math></b>	<b>colorimetría <math>b^*</math></b>	<b>Transmitancia</b>	<b>Absorbancia</b>
CCN-51	4,16	1,09	11,30	1,49	9,34	0,04	34,85	15,18	21,72	0,60	0,30
Fino de aroma	4,31	0,68	15,50	1,08	16,71	0,01	46,06	8,11	30,41	0,10	0,10

## V.2. Producción de bioetanol

Los problemas ambientales y el cambio climático ocasionados por el alto consumo de combustibles fósiles han generado un gran interés en la producción del etanol y su uso como combustible alternativo en el transporte (Agudelo, 2014). La magnitud del problema estriba en las cifras astronómicas de consumo anual de carbón, gas y petróleo. En el año 2002, por ejemplo, se consumieron 8034 millones de toneladas de petróleo, cifra que representó un aumento del consumo de 1,3%, con respecto año anterior. Nada parece indicar que ese crecimiento se detenga (actualmente se consumen 10 000 millones por año), pues no sólo los países desarrollados consumen más, sino que los menos desarrollados requieren incrementos aún mayores para su propio desarrollo, como es el caso de China, la India o Brasil (Collymore et al., 2008).

El etanol es una fuente neta de energía, fácilmente almacenable, con alto contenido de oxígeno (35 %) y combustión limpia, se le considera de gran aplicación potencial como combustible (González-Leos et al., 2017). Un recurso renovable es la biomasa generada por los organismos fotosintéticos, que almacenan la energía en forma de azúcares que se pueden transformar a etanol para uso como biocombustible por medio del proceso de fermentación (Alonso, 2018). El uso de la biomasa como potencial fuente para la producción de energía es un aspecto que es necesario investigar debido a las diferentes fuentes energéticas, la composición de estas fuentes y el potencial energético (Camargo & Williams, 2012).

En la producción del cacao se generan tres subproductos fundamentales como son la vaina de la mazorca del cacao, la cáscara de las semillas y el mucílago o exudado de cacao. La utilización de la cáscara de la vaina de cacao para la producción de bioetanol ha sido investigada por diversos autores como Hernández-Mendoza et al. (2021), Igbínador & Onilude (2013), Salim (2013), Valladares-Diestra et al. (2022) entre otros. Además, se encuentra el trabajo de Awolu & Oyeyemi (2015) que investigaron el rendimiento en bioetanol de la fermentación de cáscara de semilla de cacao. Por su parte, el mucílago del cacao ha sido poco evaluado, encontrando en la bibliografía el trabajo publicado por Roini et al. (2019). El aprovechamiento del mucílago para este u otros fines es de vital importancia para los productores de cacao, ya que durante el procesamiento del cacao pueden surgir problemas que afecten a la gestión ambiental de la eliminación del mucílago y otros residuos del cacao (Konstantas et al., 2018). Este mucílago puede ser una base adecuada para la generación de biocombustibles ya que su composición destaca un elevado contenido en polisacáridos (De Vuyst & Weckx, 2016; Rodríguez et al., 2021; Sánchez-Olaya et al., 2019; Vera-Loor et al., 2020). Como se ha mencionado anteriormente, la fermentación del cacao es una operación que se efectúa en dos fases; una anaeróbica y otra aeróbica. En la primera levaduras y bacterias ácido-lácticas predominan en el medio y metabolizan los azúcares y el ácido cítrico presente en el mucílago del cacao, generando ácido acético y etanol, subiendo la temperatura hasta los 50 °C (Afoakwa et al., 2011; Schwan & Wheals, 2004).

Las levaduras presentes en la fermentación del mucílago del cacao, entre las que se encuentra *S. cerevisiae*, pueden ser empleadas como cultivos para la producción de bioetanol. Las levaduras son los microorganismos de mayor uso en la producción de etanol, debido a su productividad, baja producción de inhibidores y facilidad de separación después de la fermentación (Sánchez et al., 2010). Este trabajo se enfocó en la obtención de bioetanol a partir

del mucílago de cacao mediante un proceso fermentativo anaerobio con la aplicación de diferentes concentraciones de levadura *S. cerevisiae*.

### **V.2.1. Parámetros fisicoquímicos**

Los resultados obtenidos de la caracterización de las fermentaciones en función de los factores variedad de mucílago de cacao, concentración de levadura y estado del mucílago se presentan en la Tabla V.2.

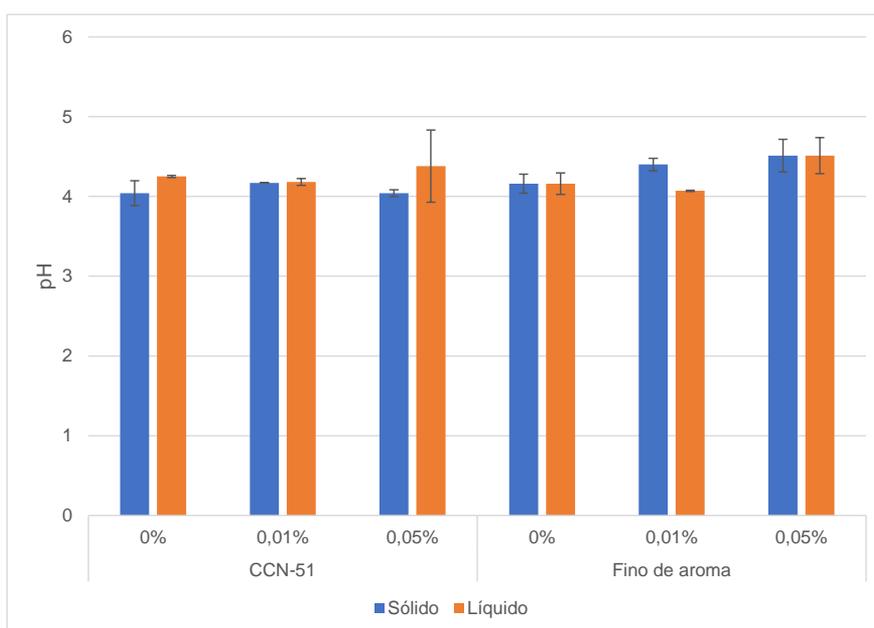
**Tabla V.2.** Efecto de los factores variedades de cacao, porcentaje de levadura y tipo de materia prima, sobre los parámetros fisicoquímicos de las fermentaciones de mucílago de cacao.

Factores	pH		Acidez (%)		Solidos Solubles Totales (°Brix)		Densidad (g/L)		Grados alcohólicos (% v/v)		Turbidez (NTU)		Calor Específico (kJ/kg °C)		Rendimiento (mL)									
	niveles	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$							
<i>Variedad mucílago (V)</i>																								
CCN51	4,18*	±	0,19	1,13	±	0,16	13,18	±	1,26	0,94	±	0,02	50,00	±	3,81	3,07	±	4,75	0,95	±	0,02	413	±	92
Fino de Aroma	4,30	±	0,22	1,19	±	0,31	13,41	±	1,01	0,95	±	0,02	51,58	±	4,77	4,66	±	2,02	0,96	±	0,01	414	±	79
<i>Levaduras concentraciones (L)</i>																								
0,00%	4,15	±	0,12	1,13	±	0,24	12,83	±	0,64	0,94	±	0,02	47,38 <sup>a</sup>	±	2,32	1,86 <sup>a</sup>	±	0,49	0,95	±	0,01	392	±	77
0,01%	4,20	±	0,13	1,18	±	0,24	13,48	±	1,31	0,94	±	0,02	52,38 <sup>b</sup>	±	4,06	3,38 <sup>a</sup>	±	4,72	0,95	±	0,01	423	±	56
0,05%	4,36	±	0,29	1,19	±	0,28	13,59	±	1,27	0,95	±	0,02	52,63 <sup>b</sup>	±	4,34	6,36 <sup>b</sup>	±	3,07	0,96	±	0,02	427	±	114
<i>Estado del Mucilago (E)</i>																								
Sólido	4,22	±	0,22	1,13	±	0,31	13,21	±	1,26	0,94	±	0,02	50,50	±	4,23	3,31	±	2,50	0,95	±	0,01	384	±	79
Líquido	4,26	±	0,20	1,20	±	0,17	13,38	±	1,02	0,95	±	0,02	51,08	±	4,54	4,43	±	4,59	0,96	±	0,01	443	±	81
P-valores																								
<i>Pruebas de efectos</i>																								
V	0,115			0,644			0,674			0,332			0,315			0,082			0,427			0,961		
L	0,081			0,909			0,461			0,756			<b>0,024</b>			<b>0,002</b>			0,658			0,549		
E	0,592			0,554			0,743			0,332			0,706			0,207			0,095			0,053		
V*L	0,247			0,461			0,976			0,756			0,161			0,188			0,658			0,616		
V*E	0,060			0,741			0,566			0,066			0,871			0,061			0,630			0,1122		
L*E	0,173			0,755			0,265			0,317			0,919			<b>0,002</b>			0,898			0,034		
V*L*E	0,915			0,917			0,774			0,203			0,248			0,082			0,084			0,786		

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

La producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao presentó valores de pH ligeramente superiores a 4 sin diferencias basadas en la variedad de mucílago, la concentración de la levadura o el estado del mucílago. Los resultados de este estudio son similares a los reportados por Castano et al. (2011) y Sánchez et al. (2010). Sin embargo, son superiores a los valores reportados por Delgado-Noboa et al. (2018).

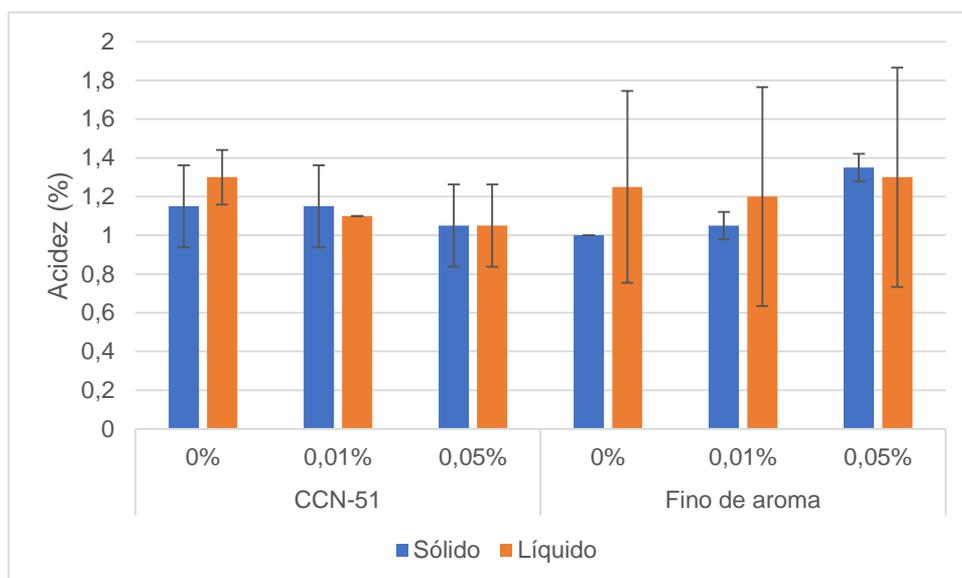
Los resultados de la Figura V.1 muestran que el pH del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao se situó entre 4,38-4,51. Este valor es ligeramente inferior al pH del etanol puro, que es de 4,7. La diferencia en el pH se debe a la presencia de ácidos orgánicos en el mucílago de cacao, como el ácido cítrico, el ácido málico y el ácido oxálico. Estos ácidos orgánicos son producidos por las bacterias productoras de ácido láctico durante la fermentación. Los resultados también muestran que el pH del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao Fino de Aroma es ligeramente superior al pH del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao CCN51. Esto se debe a que el mucílago de cacao Fino de Aroma contiene menor concentración de ácidos orgánicos que el mucílago de cacao CCN51 tal y como se muestra en tabla V.1.



**Figura V.1.** pH del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los porcentajes medios de acidez se situaron entre  $1,13 \pm 0,27$  y  $1,20 \pm 0,27$ , en los que tampoco influyeron los factores (Tabla V.2;  $p > 0,050$ ). Estos valores se encuentran en el rango de los valores observados por Díaz (2015) y Fernández (2008), que encontraron valores entre 0,0% y 1,6%. La fermentación del mucílago de cacao es rápida y no es tan ácida como la fermentación del café, que puede alcanzar valores de hasta 3,5% (Fajardo, 2019). Sin embargo, la acidez del mucílago de cacao es un factor que puede influir en la producción de bioetanol. Los valores más altos de acidez observados en el presente estudio podrían deberse a una mayor actividad de las bacterias productoras de ácido láctico, que son las responsables de la fermentación del mucílago de cacao (De Vuyst & Weckx, 2015). Además, la concentración de levadura utilizada también puede influir en la acidez del mucílago de cacao. Las levaduras también producen ácido durante la fermentación, por lo que una mayor concentración de levadura puede conducir a un aumento de la acidez. Estos resultados sugieren que es importante controlar las condiciones de fermentación para optimizar la producción de bioetanol a partir del mucílago de cacao.

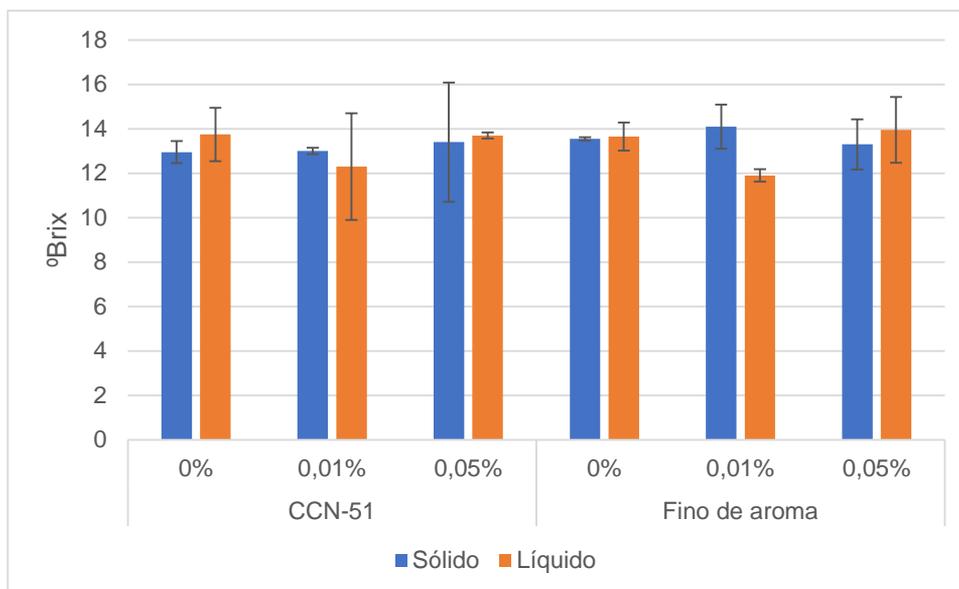
El análisis individual de los lotes de fermentaciones elaboradas mostró que los valores de acidez en el presente estudio se situaron entre  $1,00 \pm 0,01$  % del mucílago Fino de Aroma sólido sin inóculo de levaduras y  $1,35 \pm 0,07$  % en el mucílago Fino de Aroma sólido con 0,05% de inóculo (Figura V.2).



**Figura V.2.** Porcentaje de acidez del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los valores de sólidos solubles totales medios se situaron en torno a los 13°Brix (Tabla V.2), sin influencias de los factores. No se encontraron diferencias a pesar de que la materia prima presentó valores diferentes tal y como se muestra en la tabla V.1. Los valores reportados por Amaya & Díaz (2019) y Zapata (2010) están entre el 12% y el 15%, lo que indica que los resultados del presente estudio son comparables a los de otros estudios realizados con mucílago de cacao.

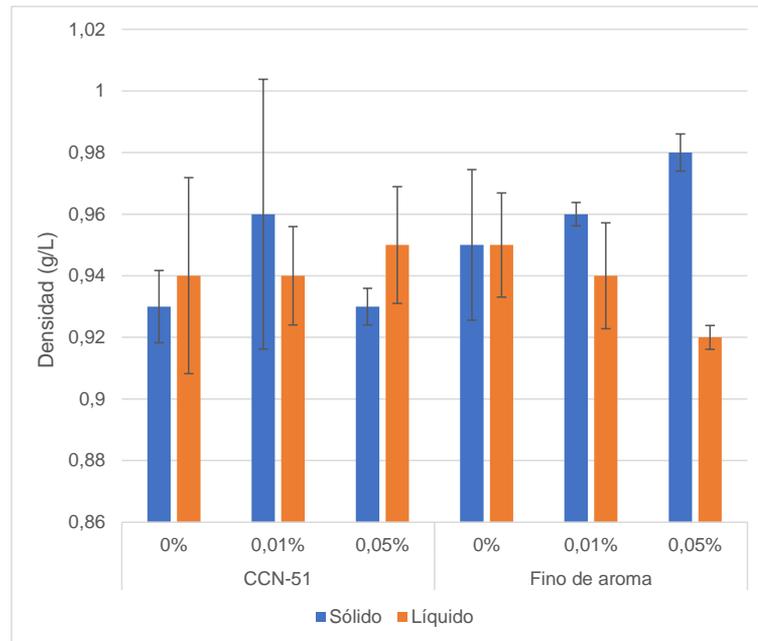
Los resultados observados sobre el contenido en sólidos solubles de los diferentes lotes se muestran en la Figura V.2. Los valores observados en todas las fermentaciones se situaron entre 11,9 y 14,1 °Brix. Como se puede observar, la aplicación del mucílago en estado sólido o líquido o las diferencias en el inóculo no modificaron significativamente los contenidos en sólidos solubles totales. Además, estos valores fueron similares a los contenidos iniciales de los mucílagos mostrados en la tabla V.1.



**Figura V.3.** Contenido en sólidos solubles totales (°Brix) del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

La densidad media se situó en valores de 0,94-0,95 (Tabla V.2). Estos valores son similares a los reportados por Santamaría et al. (1995), que encontraron densidades de 0,991-0,995 g/cm<sup>3</sup> para el bioetanol producido a partir de caña de azúcar. Sin embargo, son inferiores a los reportados por Delgado-Noboa et al. (2018), que encontraron una densidad de 1,05 g/cm<sup>3</sup> para el bioetanol producido a partir de plátano. En general, los resultados de este estudio muestran que la densidad del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao es ligeramente inferior a la densidad del bioetanol producido a partir de otras materias primas.

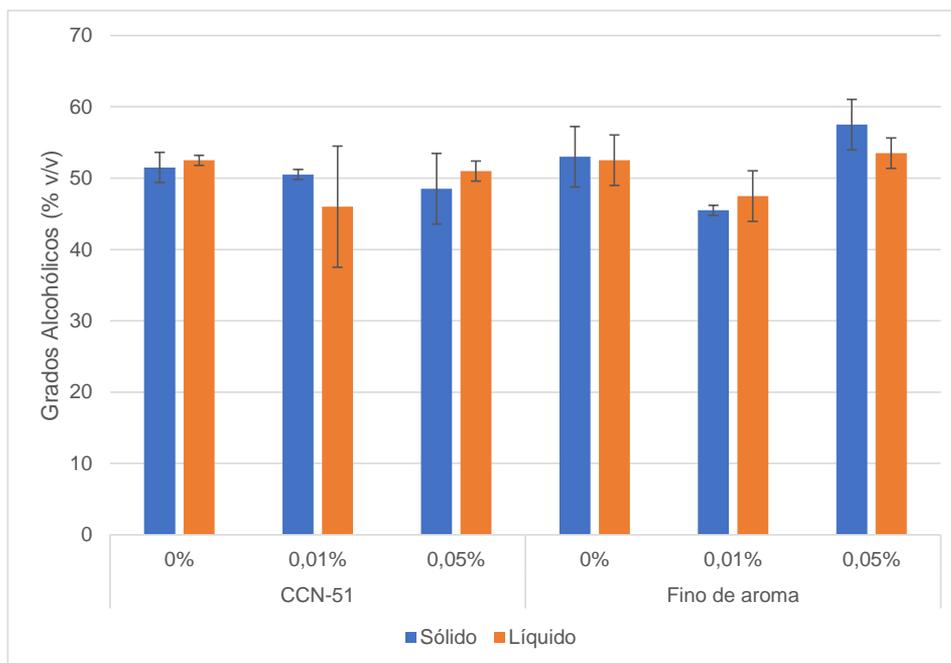
Los resultados de la Figura V.4 muestran que la densidad del bioetanol producido a partir de mucílago en los diferentes lotes se situó entre los encontrados en la fermentación de mucílago Fino de Aroma al 0,05% en estado sólido con 0,98 g/cm<sup>3</sup>, y mucílago Fino de Aroma al 0,05% en estado líquido con 0,92 g/cm<sup>3</sup>. Los valores de densidad no variaron en función del inóculo de levadura. Por ejemplo, la densidad del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao Fino de aroma al 0,01% de levadura fue de 0,94 g/cm<sup>3</sup>, mientras que la densidad del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao Fino de Aroma al 0,05% de levadura fue de 0,95 g/cm<sup>3</sup>.



**Figura V.4.** Densidad (g/L) del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las fermentaciones de mucílago de cacao presentaron una producción de alcohol media comprendida entre 47,38 y 52,63 °GL (Tabla V.2). En este caso la adición de inóculo de *S. cerevisiae* mejoró la producción de etanol significativamente ( $p=0,024$ ), pero no se observaron otros efectos significativos de los factores o de las interacciones entre ellos. El Estándar de Bebidas Alcohólicas establece que el grado alcohólico de las bebidas alcohólicas debe estar entre 39 y 54 °GL. Por lo tanto, los resultados del presente estudio están dentro de los estándares establecidos. Otros trabajos han mostrado rendimientos similares de alcohol tal y como muestran Delgado-Noboa et al. (2021) con mucílago de cacao CCN-51; Pérez-Sariñana et al. (2015) con mucílago de café.

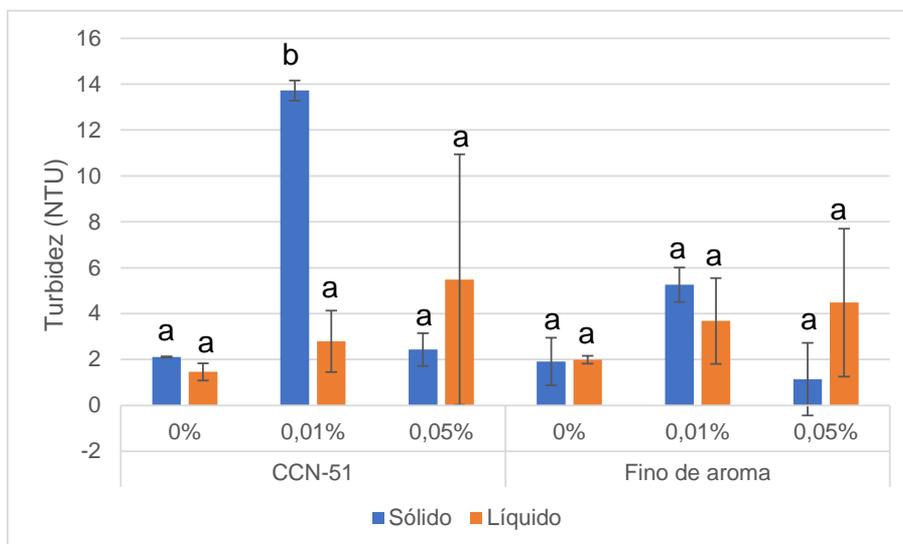
Los resultados de la Figura V.5 muestran que el grado alcohólico de las fermentaciones en los diferentes lotes se situaron entre los 45,5 °GL en el mucílago de cacao Fino de Aroma al 0,01% de levadura en estado sólido, y 57,5 °GL mucílago de cacao Fino de Aroma al 0,05% de levadura en estado sólido. Este último valor es significativamente mayor que el primero.



**Figura V.5.** Grado alcohólico (% v/v) del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los valores de turbidez no presentaron diferencias en función de la variedad de mucílago ni el estado del mismo ( $p > 0,050$ ), aunque los valores medios de Fino de Aroma y estado líquido fueron superiores (Tabla V.2). Si se observaron diferencias en la turbidez entre concentraciones de inóculos, de tal manera que las fermentaciones sin inocular presentaron valores medios de 1,86 que se incrementaron significativamente hasta 6,36 con 0,05% de inóculo ( $p = 0,002$ ). Estos resultados son similares a los reportados por Zúñiga & Gandini (2013), que encontraron turbidez de 3,40-4,75 NTU para el bioetanol producido a partir de residuos de caña de azúcar. La turbidez del bioetanol puede deberse a la presencia de partículas en suspensión, como células de levadura, proteínas y polisacáridos. La levadura es la principal responsable de la turbidez, ya que se multiplica durante la fermentación. El mucílago de cacao también puede contribuir a la turbidez, ya que contiene proteínas y polisacáridos. La turbidez del bioetanol puede ser reducida mediante la filtración o la clarificación. La filtración elimina las partículas en suspensión mediante un medio filtrante, como un filtro de papel o de malla. La clarificación elimina las partículas en suspensión mediante un proceso químico, como la coagulación o la floculación.

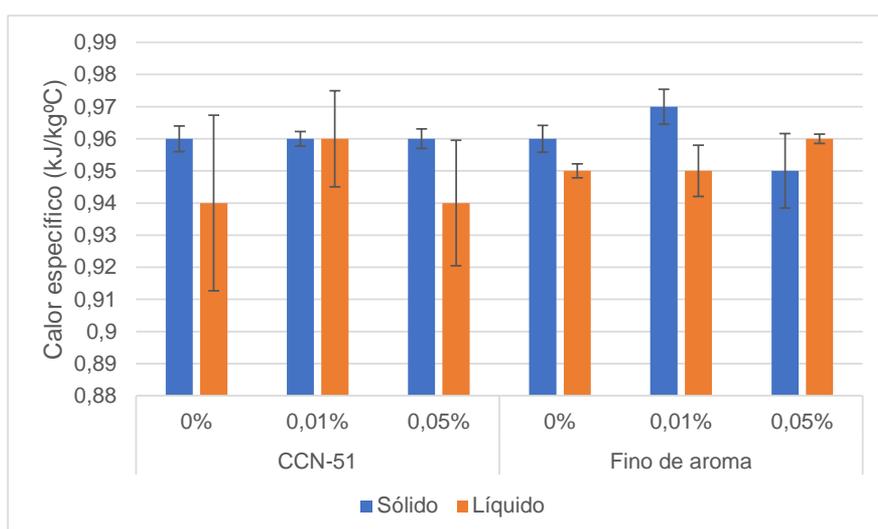
Los resultados de la Figura V.6 muestran que en general no hubo diferencias entre lotes en cuanto a la turbidez, con valores comprendidos entre 1,5 y 6 unidades NT. Sin embargo la fermentación de mucílago CCN-51 sólido con 0,01% de inóculo presentó una turbidez de 13,7 NTU, estadísticamente superior al resto ( $p < 0,050$ ).



**Figura V.6.** Turbidez (NTU) del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

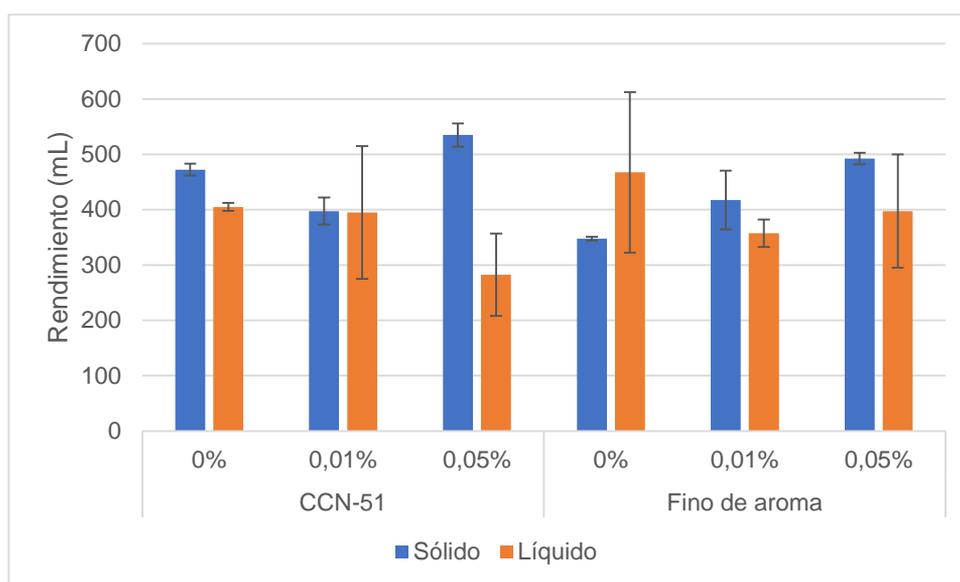
No se observaron diferencias en el calor específico de las fermentaciones (Tabla V.2), que estuvieron comprendidas entre 0,95 y 0,96 kJ/kg °C. Este valor es inferior al calor específico Escobar (2008) establece que es de 2,38 kJ/kg °C, pero similares a los mostrados por Castillo (2010) y (2012) que encontraron valores de calor específico de 0,68-0,92 kJ/kg °C para el bioetanol producido a partir de residuos de caña de azúcar. La diferencia en el calor específico se debe a la presencia de impurezas en el bioetanol, como células de levadura, proteínas y polisacáridos. Estas impurezas absorben parte del calor, lo que reduce el calor específico del bioetanol. Los resultados también muestran que el calor específico del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao en estado sólido es similar al calor específico del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao en estado líquido.

Los resultados de la Figura V.7 muestran que el calor específico del bioetanol producido a partir de mucílago de cacao en los diferentes lotes estuvo entre 0,94-0,97 kJ/kg °C. No se encontraron diferencias entre tratamientos.



**Figura V.7.** Calor específico (kJ/kg °C) del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

La producción de bioetanol media a partir de mucílago de cacao en función de los factores estuvo comprendida entre 384 mL para las presentaciones sólidas y 443 mL para las presentaciones líquidas ( $p=0,053$ ; Tabla V.2). La variedad de mucílago no presentó diferencias significativas, pero si se observó una notable diferencia media en las producciones en función del grado de inóculo, aunque sin diferencias significativas. Estos valores se encuentran en los rangos observados por Betancurt (2009) y Otero (2009), que encontraron valores de 77,52-572,64 mL para la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar. En la Figura V.8 se muestran los rendimientos de los diferentes lotes, donde se puede observar que los rendimientos estuvieron comprendidos entre  $282 \pm 75$  mL en la fermentación con mucílago CCN-51 líquido y  $535 \pm 21$  mL en la fermentación con mucílago CCN-51 sólido y 0,05% de levadura. En cualquier caso, no se encontraron diferencias significativas entre lotes.



**Figura V.8.** Rendimiento del bioetanol producido con mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma tras el inóculo de 0%, 0,01% y 0,05% de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estos resultados ponen de manifiesto la viabilidad de utilizar mucílago de cacao, tanto de la variedad Fino de Aroma como CCN-51, en forma sólida y líquida, para la producción de bioetanol, en el que la utilización de inóculos de *S. cerevisiae* contribuyen a incrementar los grados alcohólicos.

### V.3. Elaboración de bebidas fermentadas de frutas

Las bebidas fermentadas a partir de frutas, o los llamados «vinos de frutas» están elaboradas con diferentes tipos de frutas: fresa, pera, manzana, mango, naranja entre otras frutas (Berenguer et al., 2016). Los vinos de frutas son el producto resultante de la fermentación alcohólica normal de mostos de frutas frescas y sanas distintas a la uva, mostos, concentrados de frutas sanas, que han sido sometidos a las mismas prácticas que los vinos de uva y cuya graduación alcohólica mínima es de 6 grados alcoholímetros (Ley de normatividades de bebidas alcohólicas. Decreto 1686 de 2012).

Durante la fermentación alcohólica, el zumo de fruta puede sufrir una serie de variaciones que se pueden controlar. Dependiendo de la fruta empleada, hay algunos parámetros importantes que se tendrán que mantener para la aceptación de los consumidores finales, tales

como la acidez, el color (Petraovic-Tominac et al., 2013), aroma (Koppel et al., 2015; Molina et al., 2009) y el sabor distintivo, entre otros.

Este tipo de bebidas permiten aprovechar los excedentes de frutas que puede haber en la industria frutícola en algunas épocas del año. En Ecuador, debido a su exceso de producción, los frutos a considerar son la carambola (*Averrhoa carambola* L.) y la naranja. La carambola destaca por su característica forma de estrella y su color dorado macizo. La composición y las características fisicoquímicas varían ampliamente durante su maduración (Narain et al., 2001). En el caso de la naranja, las características fisicoquímicas son acidez total entre 3,5-10 % ácido tartárico, > 6 °Brix mayor y un pH entre 2,8 y 3,8 (Bedoya et al., 2005). Estos dos tipos de fruta junto con un cultivo iniciador adecuado podrían ser la base de una bebida fermentada nueva.

El mucílago del cacao es un subproducto de la industria del cacao que tiene en su composición una serie de compuestos funcionales beneficiosos para la salud del consumidor (Soares y Oliveira, 2022). El mucílago de cacao es un sustrato muy nutritivo y sin sustancias tóxicas que está compuesto por células parenquimatosas esponjosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1- 2%) y sales (8-10%). Este subproducto tiene un alto potencial como medio de cultivo para microorganismos a nivel industrial debido a su composición (Soares y Oliveira, 2022); además, de que por sí mismo tiene una población microbiana compuesta por levaduras, bacterias ácido-lácticas y ácido acéticas que permitiría llevar a cabo la fermentación de las bebidas (Rojas-Rojas et al., 2021; Syahza et al., 2021). Este subproducto se caracteriza por tener un delicioso sabor tropical que ha permitido que se utilice en distintos procesos industriales para la fabricación de distintos productos alimenticios (Freire et al., 1999; Schwan & Wheals, 2004). Así, ha sido utilizado en numerosas investigaciones para la producción de bebidas alcohólicas y en la elaboración de zumos con sabor dulce muy natural, mermeladas y otros productos procesados como refrescos, kéfir, jalea de cacao, alcohol, vinagre y nata (Días et al., 2007; Solieri y Giudici, 2009; Duarte et al., 2010; Takrama et al., 2015). En las investigaciones realizadas hasta el momento se ha demostrado que la adición del mucílago de cacao a distintos productos, debido a su aroma, favorece su aceptabilidad general.

La producción de bebidas fermentadas a base de frutas es una práctica común en la industria alimentaria. En esta Tesis Doctoral, se ha evaluado la adición de mucílago de cacao de dos variedades a distintas concentraciones para la elaboración de zumos de carambola y naranja con un cierto grado alcohólico. La combinación de frutas con el mucílago de cacao puede contribuir a mejorar la calidad y la seguridad de las bebidas fermentadas, así como a generar nuevas oportunidades de negocio para los productores de cacao en Ecuador.

### **V.3.1. Parámetros físico-químicos y composición**

En este ensayo de la Tesis Doctoral se ha procedido a estudiar la influencia de la variedad del cacao (CNN51 y fino), de la concentración de mucílago añadida (10 y 15%) y de la fruta a la que se ha añadido (carambola y naranja) sobre los parámetros físico-químicos y composición de las bebidas fermentadas (Tabla V.3.).

**TABLA V.3.** Efecto de los factores estudiados en los parámetros físico-químicos y composición de las bebidas fermentadas elaboradas con frutas y mucílago de cacao.

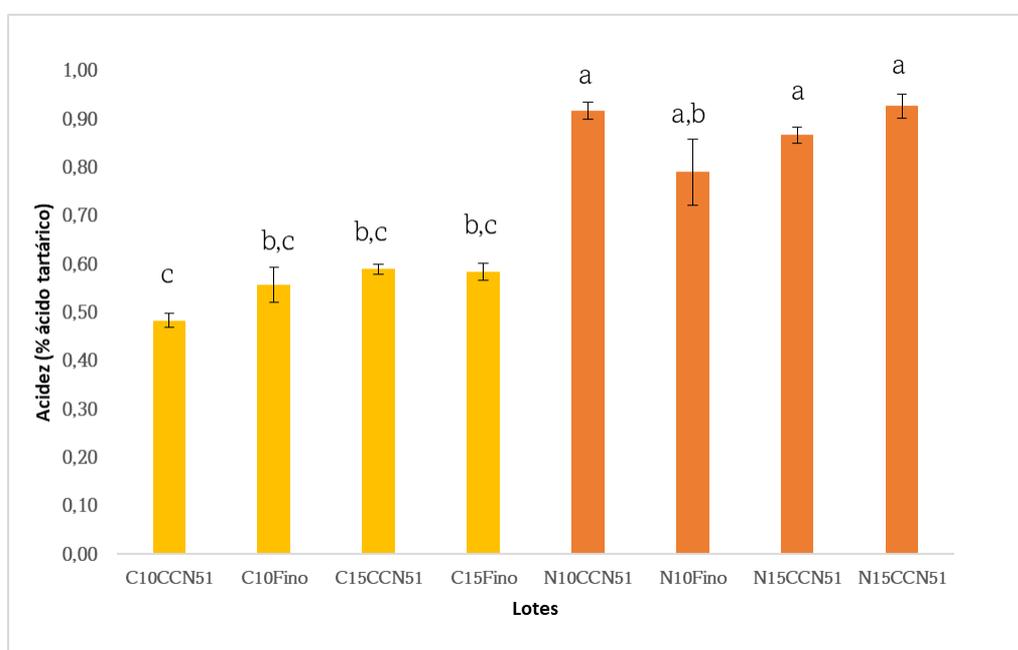
<i>Factores</i>	<b>Acidez</b>		<b>pH</b>		<b>° Brix</b>		<b>Absorbancia</b>		<b>Transmitancia</b>		<b>Sol. Suspensión</b>		<b>Densidad</b>		<b>Grado alcohólico</b>									
	niveles	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$							
<i>Fruta (F)</i>																								
Carambola	0,55 <sup>b*</sup>	±	0,08	3,68 <sup>b</sup>	±	0,03	15,79 <sup>b</sup>	±	0,75	0,52 <sup>b</sup>	±	0,14	31,42 <sup>a</sup>	±	5,6	0,009	±	0,005	0,98	±	0,00	14,83 <sup>a</sup>	±	2,04
Naranja	0,88 <sup>a</sup>	±	0,13	3,78 <sup>a</sup>	±	0,07	20,11 <sup>a</sup>	±	0,97	1,25 <sup>a</sup>	±	0,35	7,28 <sup>b</sup>	±	1,3	0,013	±	0,007	0,99	±	0,00	8,17 <sup>b</sup>	±	0,72
<i>Variedad mucílago (V)</i>																								
CCN51	0,71	±	0,19	3,73	±	0,71	17,71	±	2,72	0,93	±	0,52	19,85	±	17,09	0,013	±	0,006	0,99	±	0,005	11,75	±	3,33
Fino	0,71	±	0,20	3,74	±	0,08	18,20	±	2,06	0,85	±	0,39	18,85	±	12,16	0,010	±	0,007	0,99	±	0,005	11,25	±	4,13
<i>Concentración mucílago (C)</i>																								
10%o	0,69	±	0,22	3,71 <sup>b</sup>	±	0,07	18,22 <sup>a</sup>	±	2,71	0,87	±	0,49	20,57	±	15,59	0,013	±	0,007	0,99	±	0,005	10,75 <sup>b</sup>	±	3,17
15%	0,74	±	0,17	3,76 <sup>a</sup>	±	0,07	17,68 <sup>b</sup>	±	2,06	0,90	±	0,43	18,14	±	13,93	0,010	±	0,007	0,99	±	0,005	12,25 <sup>a</sup>	±	4,20
P-valores																								
<i>Pruebas de efectos</i>																								
F	<b>0,000</b>			<b>0,000</b>			<b>0,000</b>			<b>0,000</b>			<b>0,000</b>			0,151			1,000			<b>0,000</b>		
V	1,000			0,842			0,062			0,490			0,762			0,379			1,000			0,345		
C	0,227			<b>0,034</b>			<b>0,042</b>			0,769			0,470			0,379			1,000			<b>0,010</b>		
F*V	0,457			0,905			<b>0,021</b>			0,152			0,125			0,379			1,000			0,345		
F*C	0,793			0,842			<b>0,028</b>			0,926			0,820			0,151			1,000			0,124		
V*C	0,551			0,115			0,054			0,338			0,922			0,767			1,000			0,213		
F*V*C	0,141			0,174			<b>0,048</b>			0,122			0,226			0,767			1,000			0,213		

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

Respecto a la acidez, el análisis estadístico muestra diferencias significativas únicamente del efecto del tipo de fruta base de la bebida fermentada ( $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3). En el caso del efecto de la variedad y de la concentración de mucílago, así como de las interacciones, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ; Tabla V.3).

Los resultados mostraron que la bebida a base de naranja tenía una mayor acidez ( $0,875 \pm 0,13$  % ácido tartárico) que la elaborada a base de carambola ( $0,553 \pm 0,08$  % ácido tartárico; Tabla V.3). Estos resultados son bastante inferiores a los encontrados por Bedoya et al. (2005) y García-Zapatero et al. (2016) quienes elaboraron vino de naranja dulce (*Citrus sinensis* Speck), por fermentación inducida por *S. cerevisiae* y un vino joven de fruta de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec). Sin embargo, sí tienen más sentido cuando se comparan con los valores obtenidos por Akinwale (2000) y Igbinalolor (2009) en relación a los valores de acidez expresados en % de ácido tartárico obtenidos durante la fermentación alcohólica del mucílago de cacao (entre 0,110 y 0,945 % ácido tartárico) teniendo en cuenta que se utilizó dicho subproducto del cacao como “cultivo iniciador” de la fermentación en nuestro estudio.

En la Figura V.9. se observa que las bebidas elaboradas a base de naranja tenían una mayor acidez que las elaboradas con carambola independientemente de la variedad y de la concentración de mucílago añadidas ( $p \leq 0,05$ ).



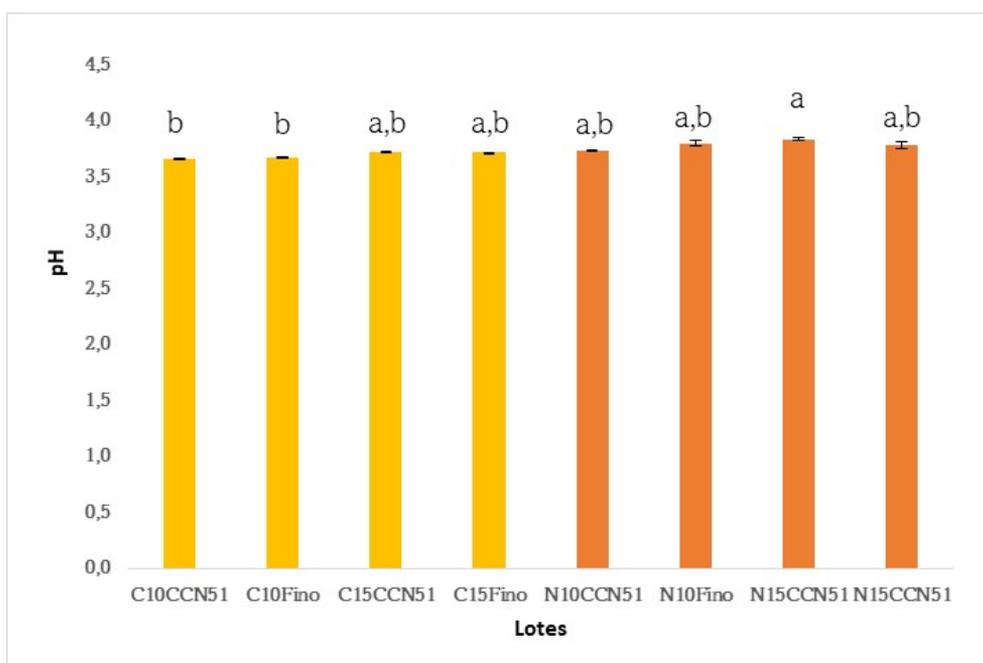
**Figura V.9.** Valores de acidez medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,05$ ).

El análisis estadístico realizado sobre la variable pH (Tabla V.3) muestra que existen diferencias significativas con respecto al tipo de fruta base de la bebida fermentada y a la concentración del mucílago añadido ( $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3). En el caso del efecto de la variedad de mucílago y de las interacciones, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,050$ ; Tabla V.3).

Atendiendo a la influencia del tipo de fruta, la bebida fermentada elaborada con carambola presentaba un pH ligeramente más ácido ( $3,68 \pm 0,03$ ) que la elaborada con naranja ( $3,78 \pm 0,07$ ). Los valores medios de pH obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de la norma de los vinos donde se referencia que el pH debe estar entre 2,8 y 3,8 (NTC 308). Estos valores son ligeramente inferiores a los publicados por Bedoya et al. (2005) en la producción de vino de naranja dulce y Bhat et al. (2011) en la elaboración de zumo de carambola tratada con radiación ultravioleta. Las diferencias encontradas en este estudio pueden deberse a la utilización de otra variedad de naranja y a la utilización de mucílago de cacao en vez de levaduras en la etapa de fermentación, ya que el pH de este subproducto oscila entre 3,80 y 3,35 a lo largo de la fermentación alcohólica (Akinwale, 2000; Igbínádólor, 2009). Por otro lado, las diferencias obtenidas entre las dos bebidas elaboradas con los dos tipos de fruta tienen sentido teniendo en cuenta que la fruta base es diferente y la carambola tiene en general valores más ácidos que la naranja (Narain et al., 2001; Bedoya et al., 2005). Diferencias en los valores de pH en función de la fruta base también fueron encontradas por Corona et al. (2016) en el análisis de distintos tipos de zumo de frutas y hortalizas (zanahoria, melón, fresa, tomate, entre otros).

En relación al efecto de la concentración de mucílago añadido, la bebida fermentada era más ácida cuanto menor era la concentración de mucílago añadida (10%;  $3,71 \pm 0,07$ ; 15%  $3,76 \pm 0,037$ , respectivamente; Tabla V.3).

En la Figura V.10. se muestran gráficamente los valores de pH medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general diferencias entre los lotes estudiados en función del tipo de fruta y de la concentración de mucílago añadido.



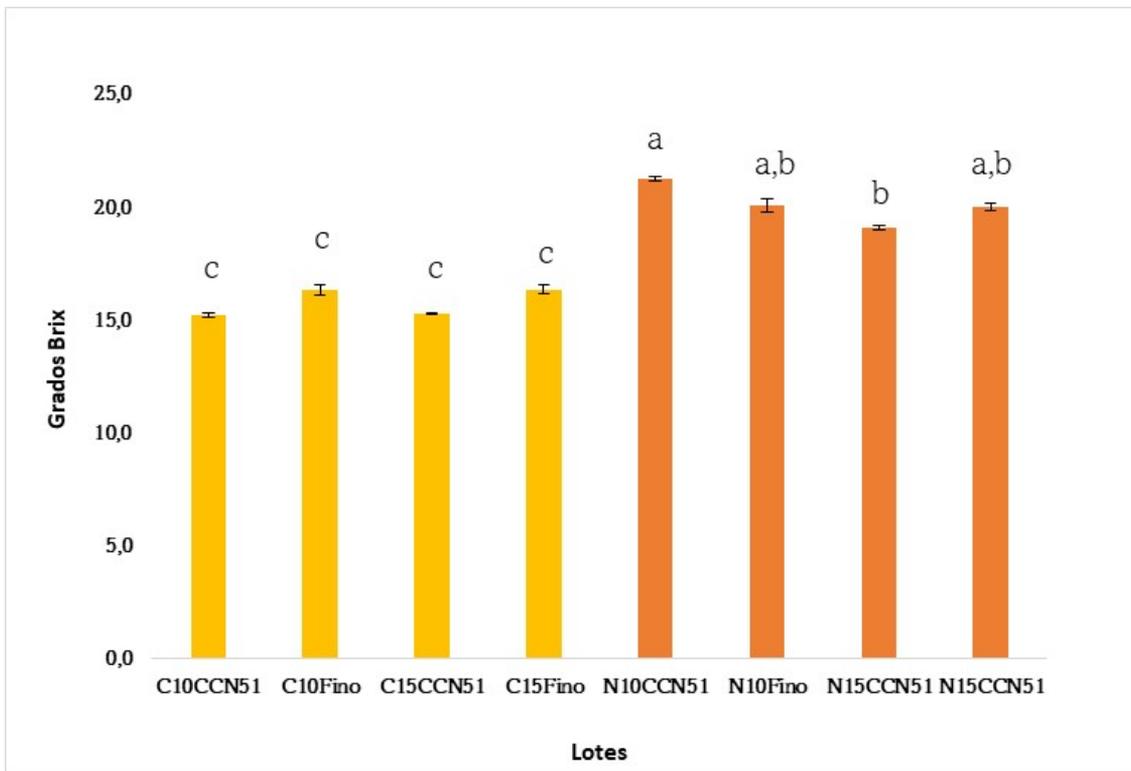
**Figura V.10.** Valores de pH medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,05$ ).

El análisis estadístico realizado sobre la variable sólidos solubles totales (°Brix) muestra que existen diferencias significativas con respecto al tipo de fruta base (F), a la concentración de mucílago añadida (C), así como a las interacciones entre el tipo de fruta y la variedad de mucílago (F\*V), el tipo de fruta y la concentración de mucílago de cacao (F\*C), y el tipo de fruta, la variedad y la concentración de mucílago de cacao (F\*V\*C) ( $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3). En el caso del efecto de la variedad de mucílago y de la interacción entre la variedad y la concentración de mucílago (V\*C) no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ; Tabla V.3).

En relación con el efecto del tipo de fruta, se observó que las bebidas elaboradas con naranja tenían un contenido de sólidos solubles superior ( $20,11 \pm 0,97$ ) al de las bebidas elaboradas con carambola ( $15,79 \pm 0,75$ ;  $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3). Estos valores son mayores a los obtenidos por Bedoya et al. (2005) y Bhat et al. (2011) que obtuvieron un contenido de sólidos solubles alrededor de 10 °Brix en la elaboración de un zumo de naranja dulce fermentada con levaduras y un zumo de carambola tratada con luz ultravioleta. La diferencia puede ser debida a la ausencia de levaduras utilizadas habitualmente en la fermentación de los zumos como *S. cerevisiae* que consumen los nutrientes de estas bebidas para la producción del alcohol, así como a la utilización del mucílago de cacao que por sí mismo aumentaría la concentración de sólidos solubles totales en las bebidas fermentadas y los microorganismos que lo componen no degradan tan eficientemente dichos solutos (Akinwale, 2000; Igbinadolor, 2009). Además, las levaduras utilizarían esos sólidos solubles (en su mayoría azúcares) para la fermentación del zumo de naranja lo que disminuye el valor de este parámetro. En el estudio llevado a cabo por Takrama et al. (2015) demostraron que las levaduras a medida que degradan los azúcares (disminución del contenido de sólidos solubles) van produciendo alcohol durante la fermentación alcohólica pero estos no se consumen en igual cantidad y rapidez, por lo que la diferente composición de las frutas base condiciona el tipo y cantidad de azúcar disponible para los microorganismos del mucílago.

Con respecto a la concentración de mucílago, la adición de una menor concentración de mucílago (10%) favoreció el contenido en sólidos solubles en relación con una mayor adición de este subproducto (15%;  $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3). Esto puede ser debido a que los microorganismos presentes en el mucílago utilicen los sólidos solubles para crecer y desarrollarse. Por tanto, una mayor concentración de mucílago implica un mayor número de microorganismos que consumen en mayor medida el contenido en estos compuestos presentes en las bebidas fermentadas.

En la Figura V.11. se muestran gráficamente los valores de contenido de sólidos solubles medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general diferencias entre los lotes estudiados en función del tipo de fruta y de la concentración de mucílago añadido.

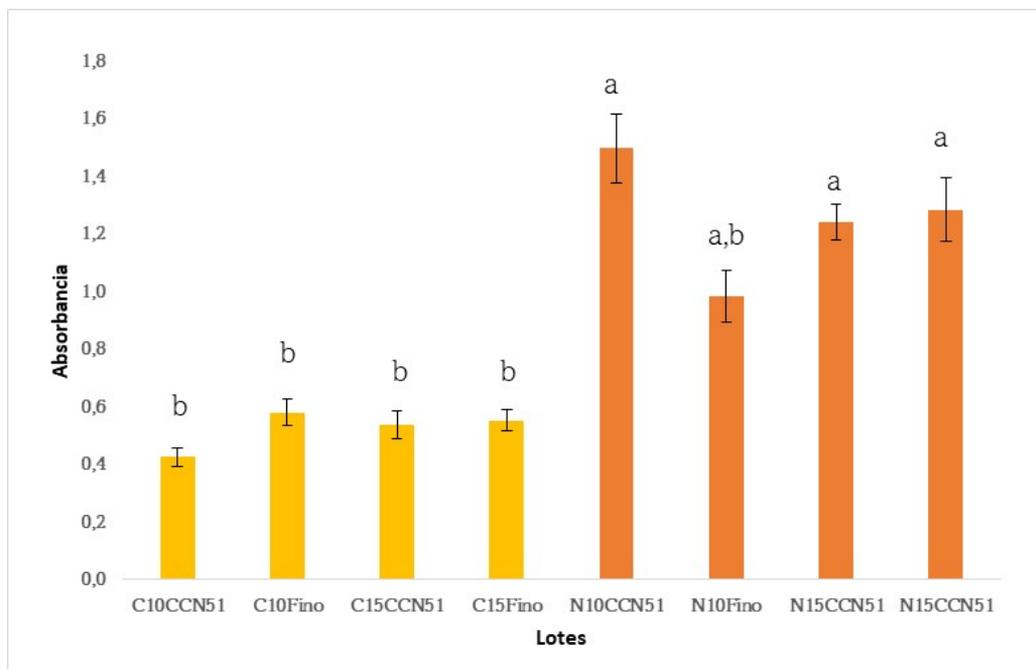


**Figura V.11.** Valores de contenido sólidos solubles totales medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

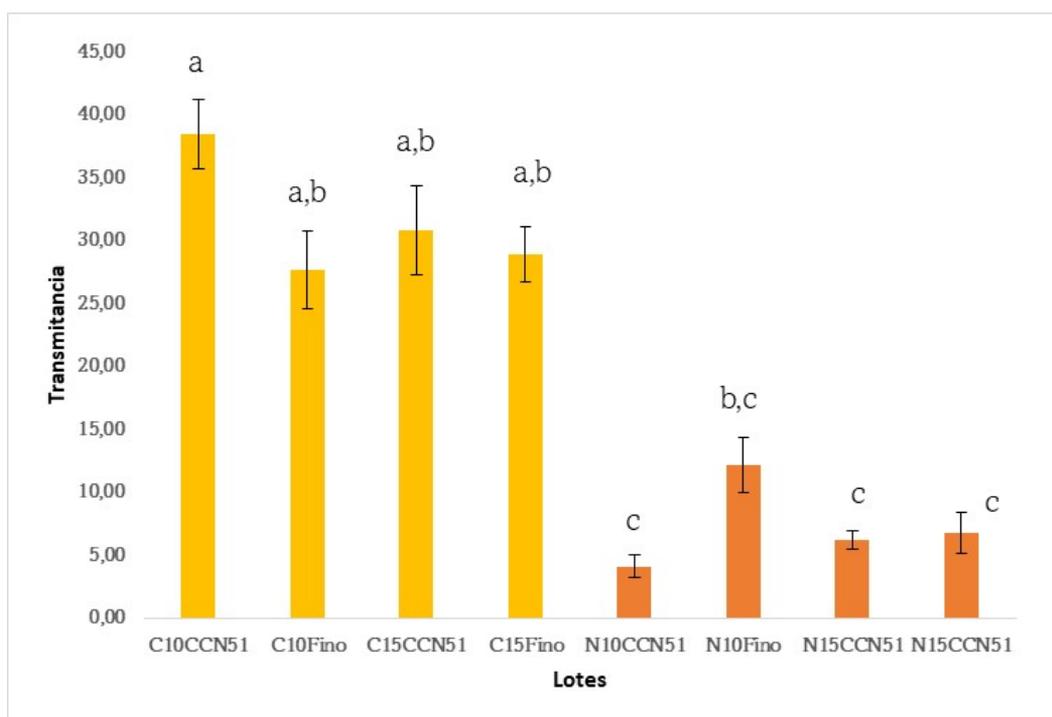
En relación con los resultados de la absorbancia y la transmitancia, el análisis estadístico muestra que únicamente existen diferencias significativas con respecto al tipo de fruta base (F) ( $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3), no existiendo diferencias en las demás variables estudiadas ni en sus interacciones ( $p > 0,05$ ; Tabla V.3).

En el caso de la absorbancia, es mayor en el caso de las bebidas elaboradas con naranja ( $1,25 \pm 0,35$ ) al de las bebidas elaboradas con carambola ( $0,52 \pm 0,14$ ;  $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3); mientras que en el caso de la transmitancia sucede lo contrario, observándose valores de este parámetro mayores en las bebidas elaboradas con carambola que en las producidas con naranja ( $31,42 \pm 5,6$  y  $7,28 \pm 1,3$ , respectivamente;  $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3).

En las Figuras V.12 y V.13 se muestran gráficamente los valores de absorbancia y transmitancia medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general diferencias entre los lotes estudiados en función del tipo de fruta base.



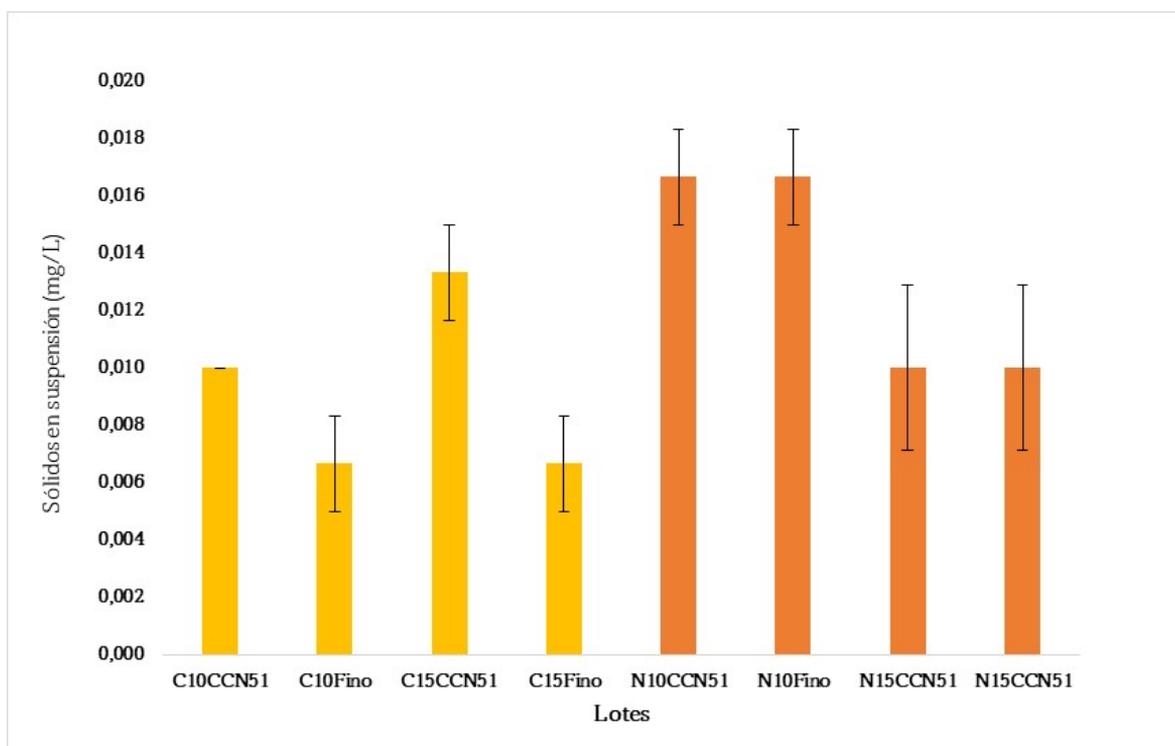
**Figura V.12.** Valores de absorbancia medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura V.13.** Valores de transmitancia medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,05$ ).

El análisis estadístico de los resultados de los sólidos en suspensión no muestra diferencias significativas con respecto a ninguno de los factores estudiados (tipo de fruta, variedad de mucílago o concentración del mismo) así como en el caso de ninguna de sus interacciones, tal y como puede observarse en la Tabla V.3 ( $p > 0,05$ ).

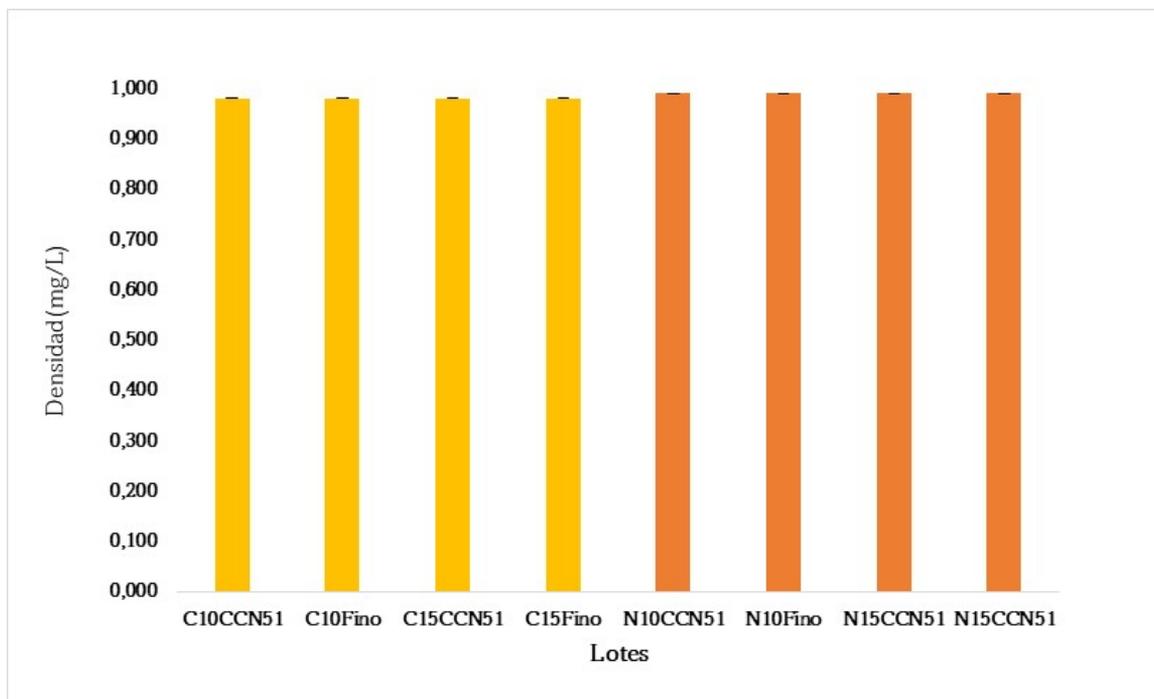
En la Figura V.14 se muestran gráficamente los valores de sólidos en suspensión medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, no observándose diferencias entre los lotes estudiados.



**Figura V.14.** Valores de sólidos en suspensión medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino.

Con respecto a la densidad, no se observa ningún efecto de los tres factores estudiados (tipo de fruta, variedad de mucílago o concentración del mismo) ni sus interacciones sobre este parámetro, tal y como se muestra en la Tabla V.3 ( $p > 0,05$ ).

En la Figura V.15 se muestran gráficamente los valores de sólidos en suspensión medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, no observándose diferencias entre los lotes estudiados.



**Figura V.15.** Valores de densidad medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino.

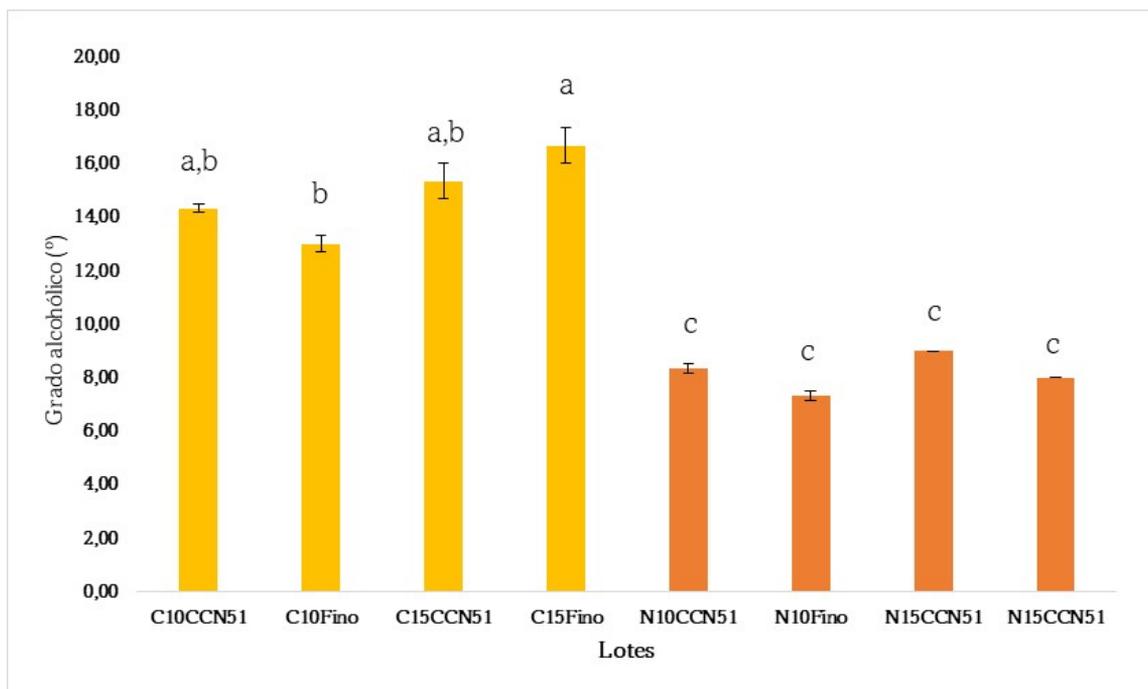
Los valores obtenidos en este estudio (0,98-0,99 mg/L) tienen sentido y son similares a los obtenidos en el mucílago del cacao al final de la fermentación alcohólica (Igbinador, 2009).

El análisis estadístico realizado sobre la variable grado alcohólico muestra que existen diferencias significativas con respecto al tipo de fruta base (F) y a la concentración de mucílago añadida (C) ( $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3), no existiendo diferencias en relación a la variedad del mucílago ni a las interacciones entre los distintos factores ( $p > 0,05$ ; Tabla 5.1).

En relación con el efecto del tipo de fruta, se observó que las bebidas elaboradas con carambola tenían un grado alcohólico superior ( $14,83 \pm 2,04$ ) al de las bebidas elaboradas con naranja ( $8,17 \pm 0,72$ ;  $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3). El contenido de alcohol de las bebidas de carambola era similar al del vino de naranja dulce elaborado mediante fermentación inducida por *S. cerevisiae* (Bedoya et al., 2005) siendo el de naranja similar al contenido de alcohol obtenido por García-Zapateiro et al. (2016) en la elaboración de vino joven de borjón. Los resultados obtenidos tienen sentido pues al igual que ocurre en la investigación llevada a cabo por Bedoya et al. (2005) a medida que hay un mayor consumo del contenido de sólidos solubles (en el caso de la carambola, el valor medio de °Brix es menor, apartado V.2.1.3) mayor es la producción de alcohol (ver Tabla V.3).

Con respecto a la concentración de mucílago, la adición de una mayor concentración de mucílago (15%) favoreció el contenido en alcohol de las bebidas elaboradas con la fruta en relación a las bebidas elaboradas con una menor concentración de mucílago (10%;  $p \leq 0,05$ ; Tabla V.3). Esto puede estar relacionado también por un mayor consumo de sólidos solubles (menor valor de °Brix, ver Tabla V.3) cuando se aplicó la mayor concentración de mucílago.

En la Figura V.16. se muestran los valores de grado alcohólico medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general diferencias entre los lotes estudiados en función del tipo de fruta y de la concentración de mucílago añadido.



**Figura V.15.** Valores de grado alcohólico medios de las bebidas fermentadas elaboradas con fruta y mucílago de cacao. Tipo de fruta: carambola (C) y naranja (N); concentración de mucílago: 10% (10) y 15% (15); variedad de mucílago: CCN51 y Fino. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,05$ ).

### V.3.2. Parámetros sensoriales

En la Tabla V.4, se muestra la influencia de la variedad del cacao (CCN51 y fino), de la concentración de mucílago añadida (10 y 15%) y de la fruta a la que se ha añadido (carambola y naranja) sobre distintos parámetros sensoriales de las bebidas fermentadas elaboradas con frutas y mucílago de cacao. Tal y como se puede observar en la Tabla V.4, se evaluó el color, olor y sabor de las bebidas, así como la dulzura (sabor a dulce) y la astringencia de las mismas. Los parámetros evaluados son similares a los utilizados por Duarte et al. (2010) para la evaluación de la aceptabilidad de vinos de frutas elaborados a partir de cacao, cacao blanco, gabirola, jaboticaba y umbú. El análisis estadístico de los resultados mostró que ninguno de los factores estudiados ni sus interacciones afectó de alguna manera a la percepción que los consumidores tenían de dichas bebidas ( $p > 0,05$ ; Tabla V.4).

**Tabla V.4.** Efecto de los factores estudiados en los parámetros sensoriales de las bebidas fermentadas elaboradas con frutas y mucílago de cacao.

Factores niveles	n	Sabor									
		Color		Olor		General		Sabor a “dulce”		Astringencia	
		$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<i>Fruta (F)</i>											
Carambola	27	7,34 ± 0,98		7,34 ± 0,49		6,67 ± 0,98		6,49 ± 1,25		5,99 ± 0,85	
Naranja	27	8,00 ± 0,49		6,83 ± 1,14		7,50 ± 1,83		7,50 ± 0,58		7,17 ± 1,03	
<i>Variiedad mucílago (V)</i>											
CCN51	27	7,50 ± 1,03		6,83 ± 0,76		7,00 ± 1,15		7,33 ± 0,70		6,50 ± 0,58	
Fino de Aroma	27	7,83 ± 0,57		7,34 ± 0,98		7,16 ± 1,80		6,67 ± 1,31		6,66 ± 1,48	
<i>Concentración mucílago (C)</i>											
10%o	27	7,33 ± 0,98		6,50 ± 0,58		6,67 ± 0,98		6,83 ± 0,31		6,33 ± 0,34	
15%	27	8,00 ± 0,49		7,67 ± 0,78		7,50 ± 1,80		7,17 ± 1,51		6,83 ± 1,51	
P-valores											
<i>Pruebas de efectos</i>											
F		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
V		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
C		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
F*V		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
F*C		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
V*C		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
F*V*C		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	

Este trabajo pone de manifiesto la viabilidad de aplicar mezclas de mucílago de cacao en bebidas fermentadas de frutas, en este caso naranja y carambola. Las propiedades físico-químicas no se vieron modificadas sensiblemente en función del tipo de mucílago y la concentración del mismo ya que fue la fruta el principal factor que definió las diferencias entre formulaciones. En cualquier caso, se presentaron elevadas aceptaciones de los productos elaborados tras el análisis sensorial.

#### V.4. Elaboración de kombucha

El té de Kombucha es una bebida endulzada comúnmente producida por la fermentación de las hojas de té negro (Laavanya et al., 2021). A veces también se ha utilizado las hojas de té verde u oolong. La fermentación de esta bebida se lleva a cabo con un cultivo de bacterias y levaduras (SCOBY) y con una fuente de azúcar durante 7 a 10 días (Martínez et al., 2018). Después de la fermentación, el té consiste en una capa de celulosa flotante en la interfaz aire líquido que está formada por las bacterias presentes en el cultivo simbiótico (también conocido comúnmente como hongo del té) y el caldo de té líquido debajo (Chen y Liu, 2000). Ese líquido del té es lo que comúnmente se conoce como té de Kombucha.

De forma habitual se utiliza en la elaboración de este tipo de bebida como fuente de azúcar, el azúcar blanco común (Lee y Kim, 2000; Najafpour et al., 2020) o azúcar moreno (Amarasinghe et al., 2018); sin embargo, de forma excepcional se han utilizado otras fuentes con un alto contenido en azúcares como por ejemplo azúcar de palma de coco y azúcar de melaza (Muhialdin et al., 2019) o miel (Watawana et al., 2017). En este sentido, sería muy

interesante la utilización del mucílago de cacao que es un subproducto de la industria del cacao infrutilizado y desaprovechado tanto en la industria original como en otras industrias alimentarias relacionadas. Este subproducto tiene un alto contenido en azúcares que varía entre un 10 y un 13% por lo que puede ser utilizado como fuente de azúcar para los microorganismos en la fermentación de distintos alimentos a nivel industrial (Igbinalolor, 2009; Soares y Oliveira, 2022).

En este ensayo de la Tesis Doctoral se ha procedido a estudiar la influencia de la concentración de mucílago añadida (15, 20 y 30%) de la variedad del cacao CCN51 sobre los parámetros fisicoquímicos y composición, microbiológicos, así como sensoriales de una bebida fermentada a base de dos tipos de té (té verde y té negro). La utilización del mucílago de cacao de la variedad CCN51 como fuente de azúcar para el SCOBY en el proceso de elaboración del té de kombucha podría contribuir a generar nuevos productos alimenticios en la industria alimentaria de Ecuador y a evitar pérdidas económicas a los productores relacionados con el sector del cacao.

#### **V.4.1. Parámetros fisicoquímicos y composición**

En la Tabla V.5 se muestra la influencia del tipo de té y de la concentración de mucílago de cacao añadida a la bebida fermentada a base de té en diferentes parámetros fisicoquímicos y de composición (acidez, pH, °Brix, absorbancia, transmitancia, sólidos en suspensión, turbidez, densidad y grado alcohólico).

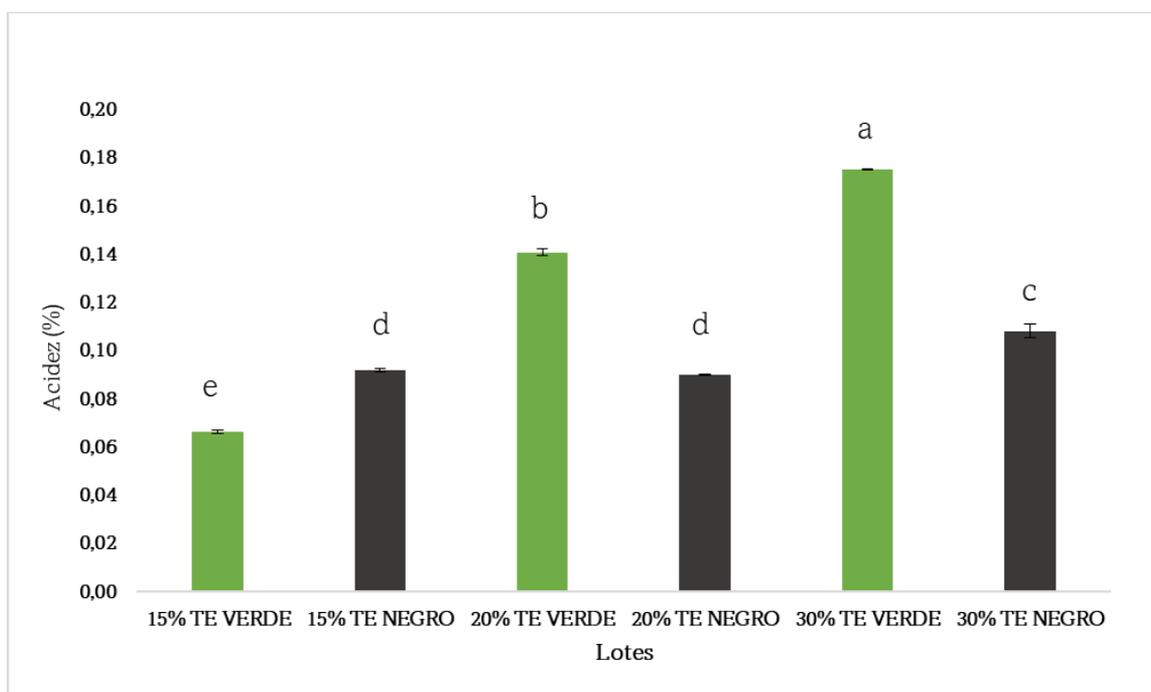
**Tabla V.5.** Efecto de los factores estudiados en los parámetros físico-químicos y composición de las bebidas fermentadas elaboradas a base de té y mucílago de cacao.

<i>Factores</i> niveles	<b>Acidez</b>		<b>pH</b>		<b>° Brix</b>		<b>Absorbancia</b>		<b>Transmitancia</b>		<b>Sol. Suspensión</b>		<b>Turbidez</b>		<b>Densidad</b>		<b>Grado alcohólico</b>	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<i>Tipo de té (T)</i>																		
Verde	0,13 <sup>a*</sup>	± 0,05	3,26 <sup>b</sup>	± 0,11	2,48 <sup>b</sup>	± 0,64	0,53 <sup>b</sup>	± 0,15	37,79 <sup>a</sup>	± 5,6	0,02	± 0,008	13,72 <sup>a</sup>	± 2,50	1,01 <sup>a</sup>	± 0,00	1,36 <sup>b</sup>	± 0,35
Negro	0,10 <sup>b</sup>	± 0,01	3,66 <sup>a</sup>	± 0,07	2,64 <sup>a</sup>	± 0,92	1,14 <sup>a</sup>	± 0,13	7,58 <sup>b</sup>	± 1,3	0,02	± 0,010	8,46 <sup>b</sup>	± 1,71	0,99 <sup>b</sup>	± 0,01	1,45 <sup>a</sup>	± 0,50
<i>Concentración mucílago (C)</i>																		
15%	0,08 <sup>c</sup>	± 0,01	3,55 <sup>a</sup>	± 0,18	1,77 <sup>b</sup>	± 0,10	0,86	± 0,32	16,93 <sup>a,b</sup>	± 10,79	0,03	± 0,01	10,57	± 3,73	0,98 <sup>b</sup>	± 0,00	0,97 <sup>b</sup>	± 0,06
20%	0,12 <sup>b</sup>	± 0,03	3,49 <sup>b</sup>	± 0,24	3,05 <sup>a</sup>	± 0,80	0,77	± 0,48	35,60 <sup>a</sup>	± 16,76	0,02	± 0,01	12,54	± 3,22	1,01 <sup>a</sup>	± 0,01	1,68 <sup>a</sup>	± 0,44
30%	0,14 <sup>a</sup>	± 0,04	3,36 <sup>c</sup>	± 0,24	2,87 <sup>a</sup>	± 0,48	0,87	± 0,25	15,52 <sup>b</sup>	± 3,25	0,02	± 0,01	10,15	± 3,38	1,01 <sup>a</sup>	± 0,01	1,58 <sup>a</sup>	± 0,26
P-valores																		
<i>Pruebas de efectos</i>																		
T	<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,049</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		0,477		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,049</b>	
C	<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		0,330		<b>0,027</b>		0,544		0,142		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>	
T*C	<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,027</b>		<b>0,018</b>		0,627		0,722		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>	

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

El análisis estadístico de la acidez muestra diferencias significativas del efecto del tipo de té de la bebida fermentada y de la concentración de mucílago añadida, así como de la interacción entre ambos factores ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5). Los resultados muestran que la bebida elaborada con té verde tenía una mayor acidez ( $0,13 \pm 0,05$  % ácido tartárico) que la elaborada a base de té negro ( $0,10 \pm 0,01$  % ácido tartárico;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5). En relación con la concentración de mucílago añadida a la bebida fermentada a base de té, se observó que a mayor concentración mayor es la acidez de la bebida ( $0,08 \pm 0,01$ ,  $0,12 \pm 0,03$  y  $0,14 \pm 0,04$  % ácido tartárico para las concentraciones de 15, 20 y 30 % de mucílago, respectivamente;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5).

En la Figura V.16, se observan los valores medios de acidez de los distintos lotes elaborados con los distintos tipos de té y las diferentes concentraciones de mucílago añadidas. En el caso del té verde, la acidez de la bebida aumenta a medida que aumenta la concentración de mucílago añadida. Sin embargo, en el caso del té negro los valores de acidez permanecen prácticamente constantes independientemente de la concentración de mucílago añadida, siendo ligeramente mayor cuando se adicionó la concentración de mucílago más alta (30 %).



**Figura V.16.** Valores de acidez medios (%) de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

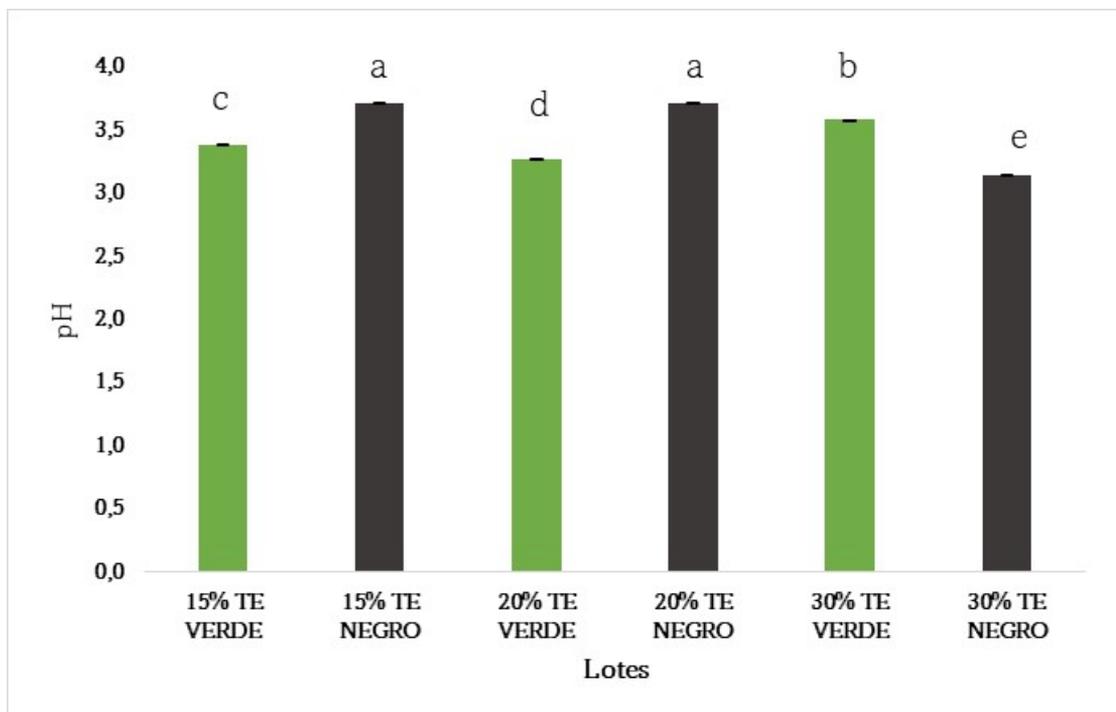
Los valores de acidez obtenidos fueron inferiores a los obtenidos por Aung y Eun (2021) que variaron entre 0,3-1,60 % y 0,4-1,70% a lo largo de la fermentación (hasta 14 días) de bebidas a partir de té negro y verde, respectivamente, mediante fermentación con SCOBY. Al igual que lo que ocurría en el estudio realizado por Aung y Eun (2021), el té verde tenía una acidez ligeramente superior a la acidez encontrada en la bebida elaborada con té negro.

En el caso de la variable pH, el análisis estadístico de los datos también muestra diferencias significativas del efecto del tipo de té de la bebida fermentada y de la concentración de mucílago añadida, así como de la interacción entre ambos factores ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5).

Atendiendo a la influencia del tipo de té, la bebida fermentada elaborada con té verde presentaba un pH más ácido ( $3,26 \pm 0,11$ ) que la elaborada con té negro ( $3,66 \pm 0,07$ ). Estos valores se encuentran dentro de los rangos encontrados por Laavanya et al. (2021) en diferentes bebidas fermentadas de té elaboradas con SCOBY siendo estos valores entre 3,2 y 5,0 dependiendo del tipo de té utilizado como base, la fuente y concentración de azúcares, el tiempo y la temperatura de fermentación, En el caso del té negro, al ser el más utilizado en la producción de kombucha, hay más estudios con los que comparar los resultados de nuestro estudio. En este estudio, el valor medio de pH de la bebida elaborada con té negro es superior al de Sharma et al. (2020) que obtuvieron valores medios de 3,2; sin embargo, fue inferior al valor medio obtenido por Amarasinghe et al. (2018). Las diferencias encontradas con respecto en los estudios pueden deberse a la cantidad y tipo de azúcar, así como a la concentración de SCOBY utilizada. Por otro las diferencias obtenidas entre las bebidas de los dos tipos de té tienen sentido teniendo en cuenta que la composición nutricional de los tés varía ligeramente y esto puede influir en las características fisicoquímicas de la bebida elaborada.

En relación al efecto de la concentración de mucílago añadido, la bebida fermentada era más ácida (menor valor de pH) cuanto mayor era la concentración de mucílago era añadida (15%;  $3,55 \pm 0,18$ ; 20%:  $3,49 \pm 0,24$  y 30%:  $3,36 \pm 0,24$ , respectivamente;  $p \leq 0,05$ ; Tabla V.5). Estos resultados pueden deberse a la utilización de mucílago de cacao como fuente de azúcar en este estudio, ya que el pH de este subproducto oscila entre 3,80 y 3,35 a lo largo de la fermentación alcohólica (Akinwale, 2000; Igbinalolor, 2009).

En la Figura V.17 se muestran gráficamente los valores de pH medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general diferencias entre los lotes estudiados en función del tipo de té y de la concentración de mucílago añadida, así como en su interacción. Se observa que, aunque en general las bebidas elaboradas con el té negro tienen un pH más básico que las elaboradas con té verde, esto varía en función de la concentración de mucílago añadido, siendo la tendencia diferente cuando se añadió un 30% de mucílago.

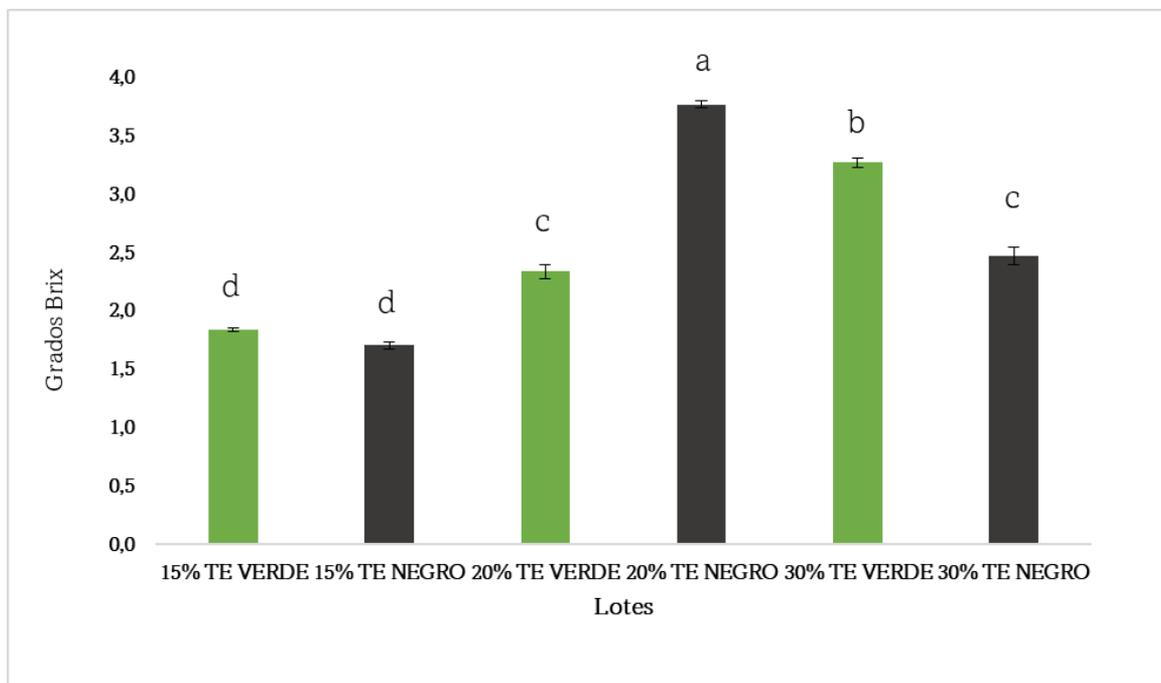


**Figura V.17.** Valores de pH medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,05$ ).

El análisis estadístico realizado sobre la variable sólidos solubles totales ( $^{\circ}$ Brix) muestra que existen diferencias significativas con respecto al tipo de té (T), a la concentración de mucílago añadida (C), así como a la interacción entre el tipo de té y la concentración de mucílago añadida (T\*C) ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5).

En relación con el efecto del tipo de té, se observó que las bebidas elaboradas con té verde tenían un contenido de sólidos solubles inferior ( $2,48 \pm 0,64$ ) al de las bebidas elaboradas con té negro ( $2,64 \pm 0,92$ ;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5). Con respecto a la concentración de mucílago, la adición de mayores concentraciones de mucílago a la bebida elaborada con té (20%:  $3,05 \pm 0,80$  y 30%:  $2,87 \pm 0,48$ ), favoreció el contenido en sólidos solubles en relación con una menor adición de este subproducto (15%:  $1,77 \pm 0,10$ ;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5).

Aún, así tal y como se puede ver en la Figura V.18, en la que se muestran gráficamente los valores medios de contenido de sólidos solubles de los distintos lotes estudiados en este ensayo, la interacción entre las dos variables estudiadas (tipo de té y concentración de mucílago añadida) es lo que más afecta ya que en el caso de las bebidas elaboradas con un 15% de mucílago, no se observaron diferencias entre las bebidas elaboradas con los dos tipos de té; sin embargo, en el caso de las elaboradas con un 20% de mucílago, la bebida producida con té negro obtuvo un mayor valor de  $^{\circ}$ Brix mientras que cuando se adicionó un 30% de mucílago fue la bebida a base de té verde la que tuvo un mayor contenido en sólidos solubles que su homóloga con el té negro.



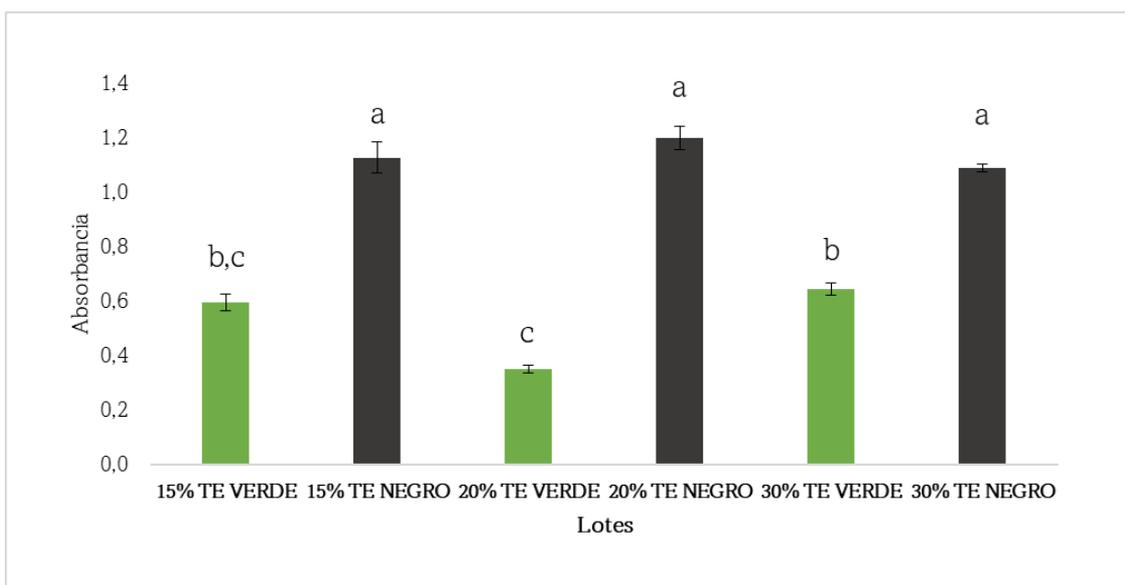
**Figura V.18.** Valores de sólidos solubles totales (expresados en °Brix) medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

Los valores obtenidos en relación al contenido de sólidos solubles totales son inferiores a los obtenidos por Nguyen y Chuyen (2019) en su estudio sobre la elaboración de té a partir de Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) que obtuvieron valores alrededor de 4,2 °Brix así como a los obtenidos por Aung y Eun (2021) en la elaboración de bebidas elaboradas a partir de té negro y verde quienes obtuvieron valores de 4,17 y 6,20 °Brix, respectivamente. Parece que los azúcares y nutrientes del mucílago de cacao son una fuente de energía más accesible que otras utilizadas en trabajos previos (azúcar blanco, azúcar moreno, etc.) para que se lleve a cabo adecuadamente el proceso de fermentación en la elaboración de bebidas fermentadas a base de té en este trabajo.

Las diferencias existentes con respecto a la concentración de mucílago añadida pueden en un principio sorprender debido al hecho de que cuando se añade la concentración más baja (15%) es cuando menos contenido de sólidos solubles fue encontrado; sin embargo, tal y como se ha comentado en el capítulo anterior, el propio mucílago de cacao es un subproducto con valores en °Brix elevados (Akinwale, 2000; Igbinador, 2009) que pueden favorecer la presencia de estos sólidos solubles en las bebidas elaboradas.

Con respecto a los resultados de la absorbancia y la transmitancia, el análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas con respecto al tipo de té base (T) y a la interacción entre el tipo de té y la concentración de mucílago añadida (T\*C) ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5) en el caso de ambas variables. En el caso de la transmitancia también se observan diferencias en el caso de la concentración de mucílago añadida, aunque esto no ocurre en el caso de la absorbancia (Tabla V.5).

En la Figura V.19 se muestran gráficamente los valores de medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general que las bebidas elaboradas con té negro tenían una absorbancia mayor que aquellas elaboradas con té verde a las que se añadió la misma concentración de mucílago. Estos resultados tienen sentido pues al tener la bebida elaborada con té negro una coloración más oscura es normal que absorba una mayor cantidad de energía radiante incidente. Los valores obtenidos en este estudio son superiores a los encontrados por Bartolo et al, (2013) quienes encontraron valores inferiores a 0,0070 en una bebida fermentada conocida como "Chica de Jora".



**Figura V.19.** Valores de absorbancia medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51, Tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

En la Figura V.20 se muestra gráficamente los valores de transmitancia medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general una mayor transmitancia en el caso de las bebidas elaboradas con té verde que en aquellas con té negro, encontrándose dentro de los valores esperados.

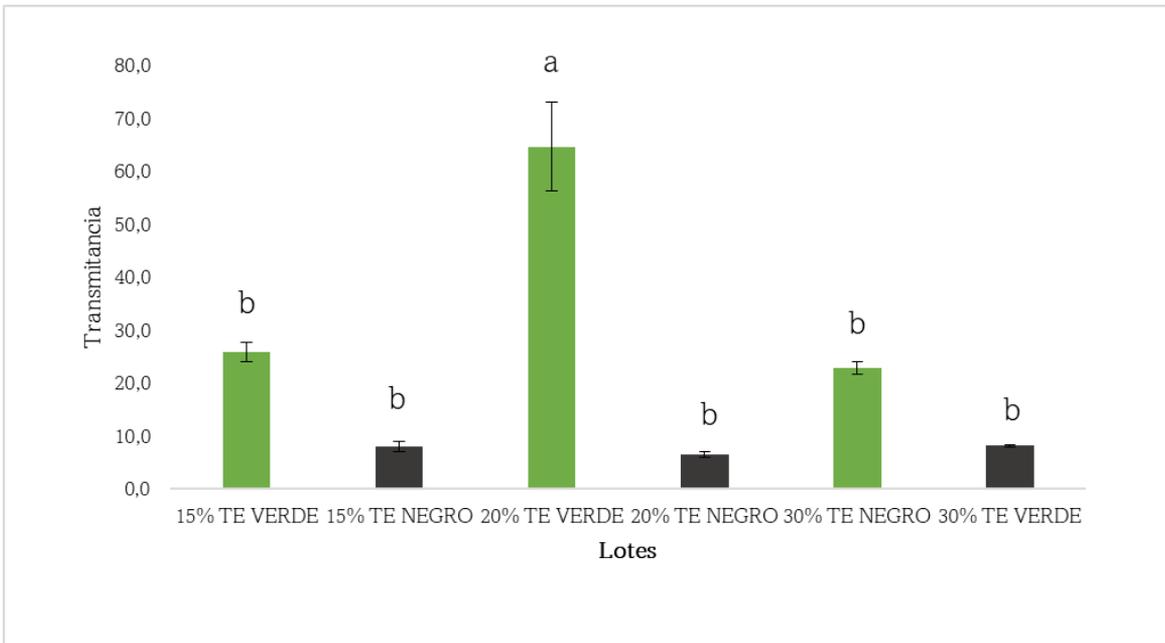


Figura V.20. Valores de transmitancia medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

El análisis estadístico de los resultados de los sólidos en suspensión no muestra diferencias significativas con respecto a ninguno de los factores estudiados (tipo de té o concentración del mucílago) así como tampoco en el caso de la interacción entre ambos factores como puede observarse en la Tabla V.5 ( $p > 0,050$ ).

En la Figura V.21 se muestran gráficamente los valores de sólidos en suspensión medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, no observándose diferencias entre los lotes estudiados con valores medios entre 0,016 y 0,026 (mg/L).

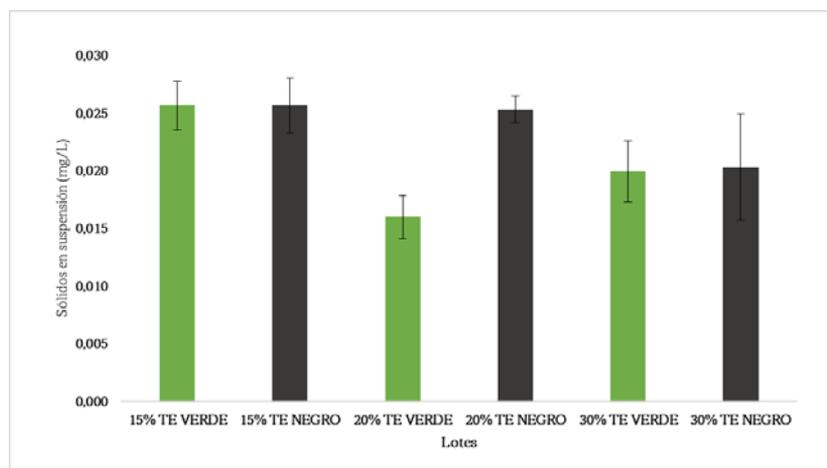
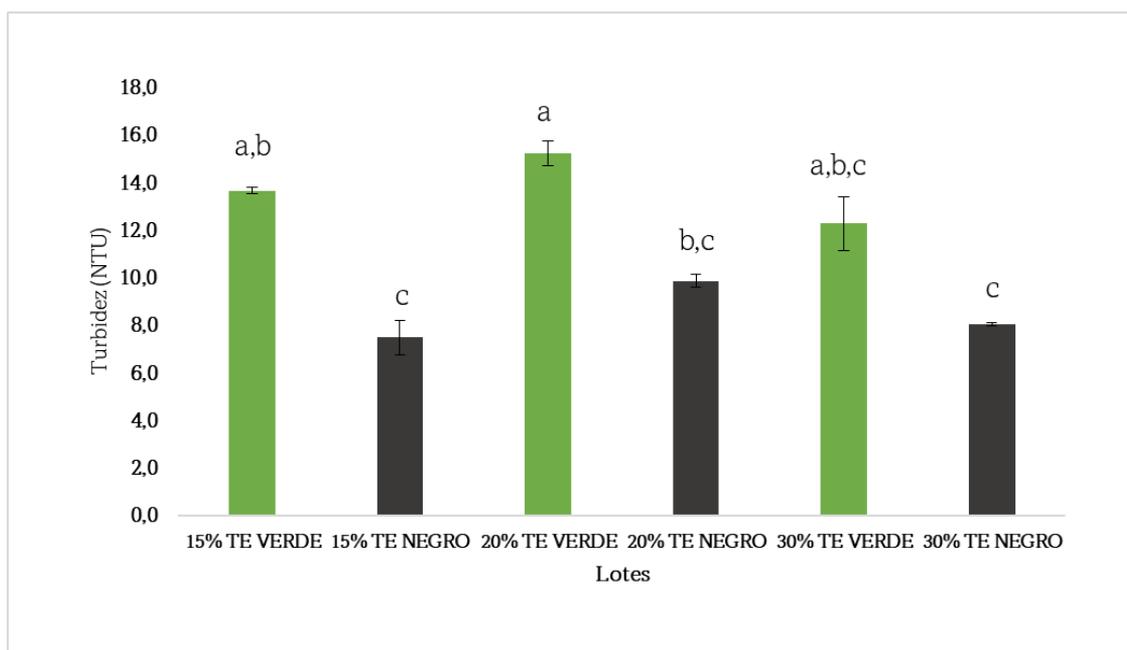


Figura V.21. Valores de sólidos en suspensión medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%.

El análisis estadístico realizado sobre turbidez muestra que existen diferencias significativas con respecto al tipo de té (T) ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5); sin embargo, no existen diferencias significativas en relación con la concentración de mucílago añadida (C), ni a la interacción entre ambas variables (T\*C) ( $p > 0,050$ ; Tabla V.5).

En relación con el efecto del tipo de té, se observó que las bebidas elaboradas con té verde tenían una turbidez mayor ( $13,72 \pm 2,50$ ) que las bebidas elaboradas con té negro ( $8,46 \pm 1,71$ ;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5). Los valores de turbidez obtenidos son inferiores a los encontrados por Castañeda et al, (2018) en su estudio sobre la elaboración de cerveza tipo Ale a base de cebada (*Hordeum vulgare*) malteada. La turbidez de las bebidas fermentadas como, por ejemplo, zumos, té de kombucha y cervezas es debido a la presencia de pectina y otros agentes enturbiantes, por lo que muchas veces es necesaria una etapa de clarificación y/o la adición de peptinasas en la elaboración de estas bebidas (Vásquez y Medina, 2010). Este aspecto es un valor negativo en cuanto a la adherencia de los consumidores a un determinado tipo de bebida fermentada como pusieron de manifiesto Amarasinghe et al. (2018) en su estudio sobre el efecto de una fermentación más prolongada en las características fisicoquímicas del té de kombucha.

En la Figura V.22 se muestran gráficamente los valores de turbidez medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose diferencias principalmente debido al tipo de té utilizado, tal y como mostraba el tratamiento estadístico. El hecho del que el té de kombucha elaborado con té verde tenga una mayor turbidez que el elaborado con té negro puede deberse al hecho de que según estudios anteriores el contenido de pectina del té verde es mayor al encontrado en té negro, siendo éste un componente clave en el enturbiamiento de las bebidas (Ele-Ekouna et al., 2011; Sen y Uguzdogan, 2022) como se ha comentado anteriormente.

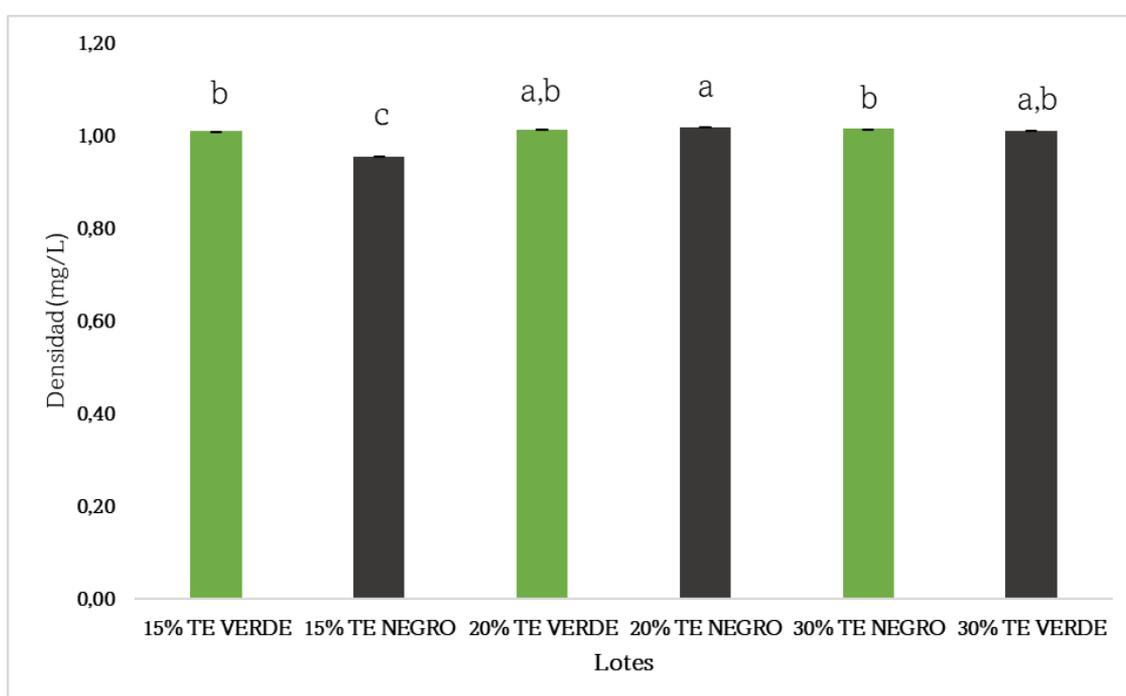


**Figura V.22.** Valores de turbidez medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

El análisis estadístico de los resultados de la densidad muestra diferencias significativas con respecto a los dos tipos de factores estudiados (tipo de té y concentración del mucílago) así como en el caso de la interacción entre ambos factores tal y como puede observarse en la Tabla V.5 ( $p \leq 0,050$ ).

En relación con el efecto del tipo de té, se observó que las bebidas elaboradas con té verde tenían una densidad mayor ( $1,01 \pm 0,002$ ) que las bebidas elaboradas con té negro ( $0,99 \pm 0,01$ ;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5). Con respecto a la concentración de mucílago, la adición de mayores concentraciones de mucílago a la bebida elaborada con té (20 y 30%) tenían una mayor densidad que las bebidas a las que se le adicionó la menor concentración de mucílago (15%) (20 y 30%;  $1,01 \pm 0,01$  y 15%:  $0,98 \pm 0,00$ ;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5).

En la Figura V.23 se muestran gráficamente los valores de densidad medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general diferencias entre los lotes estudiados en función del tipo de té y de la concentración de mucílago añadida, así como en su interacción. Lo más destacado es que, en general, tienen una mayor densidad las bebidas elaboradas con té verde, siendo este efecto más acusado cuando se adiciona a la bebida la menor cantidad de mucílago evaluada (15%).



**Figura V.23.** Valores de densidad medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

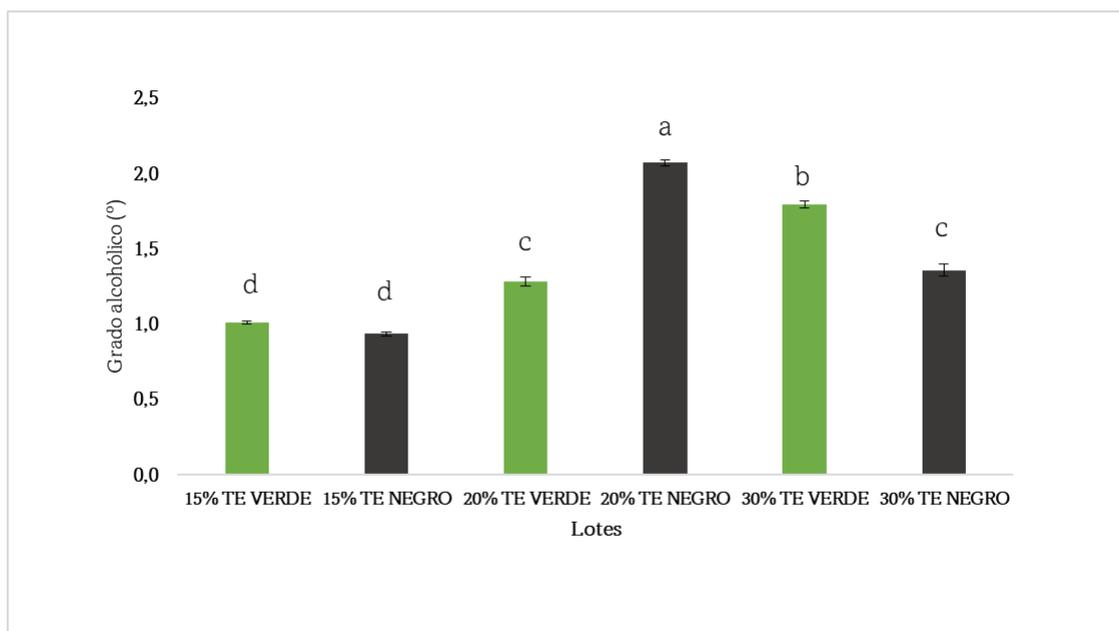
Los valores obtenidos en este estudio son similares a los encontrados por Solórzano et al. (2019) quienes encontraron valores de densidad de 1,041 a 1,098 mg/L en su investigación llevada a cabo para la producción de cuatro licores de frutas (*Passiflora edulis*, *Citrus cinensis*, *Citrus nobilis* y *Citrus máxima*). También los valores de densidad medios de las distintas bebidas elaboradas con té y con las distintas concentraciones de mucílago son ligeramente

inferiores a los encontrados por Rodríguez-Villacis y Hernández-Monzón (2017) en el desarrollo de una bebida fermentada de suero con la adición de jugo de *Aloe vera* y pulpa de fruta quienes encontraron valores de densidad en torno a 1,024 mg/L.

El análisis estadístico realizado sobre el grado alcohólico (°GL) muestra que existen diferencias significativas con respecto al tipo de té (T), a la concentración de mucílago añadida (C), así como a la interacción entre el tipo de té y la concentración de mucílago añadida ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5).

En relación con el efecto del tipo de té, se observó que las bebidas elaboradas con té verde tenían un grado alcohólico inferior ( $1,36 \pm 0,35$ ) al de las bebidas elaboradas con té negro ( $1,45 \pm 0,50$ ;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5). Con respecto a la concentración de mucílago, la adición de mayores concentraciones de mucílago a la bebida elaborada con té (20%:  $1,68 \pm 0,44$  y 30%:  $1,58 \pm 0,26$ ), tenían un mayor grado alcohólico que aquellas bebidas a las que se les adicionó una menor concentración de este subproducto (15%:  $0,97 \pm 0,06$ ;  $p \leq 0,050$ ; Tabla V.5).

En la Figura V.24 se muestran gráficamente los valores de grado alcohólico medios de los distintos lotes estudiados en este ensayo, observándose en general diferencias entre los lotes estudiados en función del tipo de té y de la concentración de mucílago añadida, así como en su interacción. Se observa que, cuando la concentración de mucílago fue de 15%, el grado alcohólico fue igual independientemente del tipo de té utilizado para la bebida fermentada; sin embargo, cuando se añadió un 20 y un 30% de mucílago, el grado alcohólico aumentó y éste fue diferente en función del tipo de té utilizado, siendo superior el grado alcohólico en la bebida elaborada con té negro cuando se añadió un 20% de mucílago de cacao y con té verde cuando se añadió la mayor cantidad de mucílago evaluada en este trabajo.

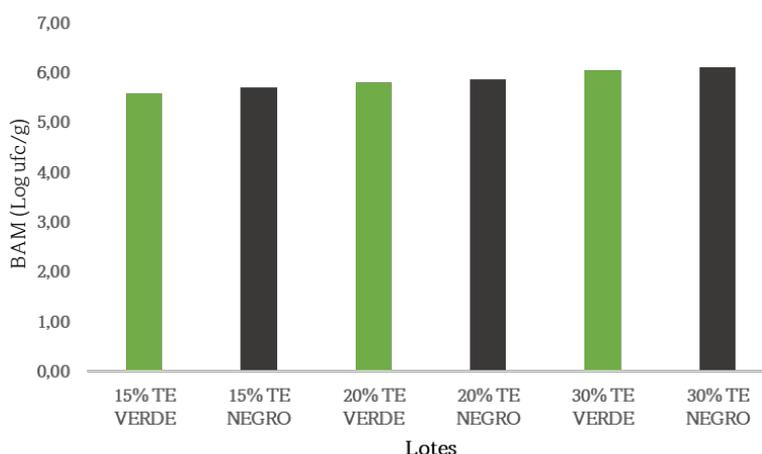


**Figura V.24.** Valores de grado alcohólico medios de las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%. Columnas con diferentes letras minúsculas como superíndice indican diferencias significativas entre lotes ( $p \leq 0,050$ ).

Los valores medios de grado alcohólico obtenidos en esta Tesis Doctoral se encuentran en el rango de los valores obtenidos por Muzaifa et al. (2021) en su estudio en el que elaboraron un té de kombucha mediante la adición del fruto de la pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) que obtuvieron valores entre 0,60 y 1,31%. Los valores medios de grado alcohólico obtenidos en este estudio podrían tener consecuencias a nivel legislativo. De hecho, la kombucha está clasificada como bebida no alcohólica siempre que su contenido de alcohol no supere un valor umbral. En Estados Unidos este umbral está fijado en 0,5% (Code of Federal Regulations, Title 27: Alcohol, Tobacco and Firearms [Alcoholic content, 1993]), mientras que, en la Unión Europea, este límite se fija en el 1,2% (Reglamento [UE] No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo [Diario Oficial de la Unión Europea, 2011]). Sólo las bebidas elaboradas con un 15 % de mucílago de cacao cumplirían la normativa europea y ninguna de las bebidas elaboradas en este trabajo cumpliría la normativa estadounidense.

#### V.4.2. Parámetros microbiológicos

En la Figura V.25 se muestran gráficamente los valores medios de los recuentos de las bacterias aerobias mesófilas totales que variaron entre 5,56 y 6,10 log ufc/g, no encontrándose diferencias entre los diferentes lotes analizados en función del tipo de té base y la concentración de mucílago añadida. En este trabajo también se analizó la presencia de levaduras encontrándose valores muy similares a los detectados en el caso de los microorganismos aerobios mesófilos totales, por lo que la mayoría de los microorganismos que componen este grupo parecen ser levaduras. Estos resultados tienen sentido pues además de los microorganismos que componen el SCOBY, se encontrarían los microorganismos añadidos por el propio mucílago de cacao, pues éste es un subproducto que de por sí tiene un elevado recuento de levaduras, siendo las especies de levaduras principales aisladas *Saccharomyces cerevisiae*, *Koleckera apiculata*, *Kluyveremycetes marxianus*, *Pichia fermentans*, *Lodderomyces elongisporus* y *Candida bombi* (Igbinador, 2009).



**Figura V.25.** Valores de recuentos de las bacterias aerobias mesófilos totales (BAM) analizados en las bebidas fermentadas a base de té con distintas concentraciones de mucílago de la variedad de cacao CCN51; tipo de té: verde y negro; concentración de mucílago: 15%, 20% y 30%.

También se evaluó la presencia de otros microorganismos como *Salmonella* spp. y *E. coli*, no encontrándose recuentos por encima de límite de detección (datos no mostrados).

### V.4.3. Parámetros sensoriales

En la Tabla V.6 se muestra la influencia de la concentración de mucílago añadida (15, 20 y 30 %) y del tipo de té la que se ha añadido (verde y negro) sobre distintos parámetros sensoriales de las bebidas fermentadas elaboradas con té y mucílago de cacao de la variedad CCN51. Tal y como se puede observar en la Tabla V.6, se evaluó el color, aroma, sabor y apariencia de las mismas. Los parámetros evaluados son más generales que los utilizados por Tran et al. (2020) y para la evaluación de los parámetros microbiológicos y tecnológicos sobre la composición química y la calidad sensorial del té de kombucha; sin embargo, estos fueron similares a los analizados por Abuduaibifu y Tamer (2019) en la evaluación de las propiedades sensoriales del té de kombucha elaborado con las bayas de goji. El análisis estadístico de los resultados mostró que ninguno de los factores estudiados ni sus interacciones afectó a la percepción de la apariencia y el color que los consumidores tenían de dichas bebidas ( $p > 0,050$ ; Tabla V.6); sin embargo, sí se encontraron diferencias en relación al factor concentración de mucílago añadido en el caso del aroma y de la interacción entre el tipo de té utilizado y la concentración de mucílago añadida en el caso del aroma y el sabor de las bebidas ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.6).

**Tabla V.6.** Efecto de los factores estudiados en los parámetros sensoriales evaluados de las bebidas fermentadas elaboradas a base de té y mucílago de cacao.

Factores niveles	n	Apariencia		Color		Aroma		Sabor	
		$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<i>Tipo de té (T)</i>									
Verde	27	8,11*	± 1,17	6,17	± 1,75	6,00 <sup>b</sup>	± 2,56	6,56	± 1,84
Negro	27	6,83	± 1,77	7,50	± 1,48	6,44 <sup>a</sup>	± 1,74	7,11	± 1,64
<i>Concentración mucílago (C)</i>									
15%	27	7,33	± 1,81	5,58	± 1,43	4,75 <sup>b</sup>	± 2,20	6,75	± 1,92
20%	27	7,17	± 1,72	7,17	± 1,72	7,17 <sup>a</sup>	± 1,72	6,59	± 1,77
30%	27	7,92	± 1,43	7,75	± 1,41	6,22 <sup>ab</sup>	± 2,14	7,17	± 1,72
P-valores									
<i>Pruebas de efectos</i>									
T		0,118		0,078		0,491		0,210	
C		0,705		0,063		<b>0,018</b>		0,523	
T*C		0,572		0,782		<b>0,003</b>		<b>0,000</b>	

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

## V.5. Elaboración de cerveza artesanal

La cerveza es la tercera bebida más consumida en el mundo después del agua y el té y la primera entre las bebidas alcohólicas (Gómez-Corona et al., 2016a). La industria cervecera ha presentado un crecimiento alto en los últimos años, principalmente en el mercado de elaboración de cerveza artesanal, donde el proceso debe ser más cuidadoso debido a la poca tecnología que se emplea para su elaboración (Gómez-Corona et al., 2016b). Concretamente en Ecuador se consumen 300 millones de litros al año, lo que equivale a un total de 25 litros por capital. Las características de las cervezas artesanales varían en comparación con una cerveza comercial. Algunos factores de variación importantes son los bajos volúmenes de producción, el cuidado y dedicación del maestro cervecero durante la elaboración, la gasificación y el uso de ingredientes tradicionales (Baiano, 202).

Debido a las diferencias y complejidad de las cervezas, estas pueden ser clasificadas por su color, contenido en alcohol, origen y otras propiedades. Sin embargo, la clasificación tradicional y más comúnmente utilizada se basa en el tipo de levaduras empleada: fermentación alta o tipo Ale (16-29°C) y fermentación baja o tipo lager (Lelièvre-Desmas et al., 2015).

Los ingredientes básicos que intervienen en la cerveza artesanal son una fuente de carbohidratos (generalmente procedente de cebada malteada), el agua, el lúpulo y la levadura, con diferentes componentes que interactúan durante la elaboración de la cerveza y la fermentación y crean productos diferentes (Pino et al., 2018; Villacreces et al., 2022). La elaboración de cervezas artesanales combina recetas tradicionales con una búsqueda de diferenciación por medio de nuevos ingredientes para crear nuevos estilos (Villacreces et al., 2022). La incorporación de nuevos ingredientes puede causar impactos negativos y positivos en el resultado final del producto, por lo cual se debe comprender mediante métodos analíticos la influencia de estos nuevos ingredientes como reemplazo parcial en la cerveza, para otorgar un producto de calidad (Guzmán, 2019; Medoro et al., 2016; Segobia, 2022). Las cervezas artesanales buscan su diferenciación a través del empleo de materias primas locales con alta calidad tales como frutas, hierbas, especias y vegetales para añadir localismo y toques únicos (Donadini & Porreta, 2017). Aunque las cervezas artesanales son están normalmente basadas en cebada malteada, las formulas frecuentemente incluyen otros cereales tanto malteados como no malteados como el trigo, arroz, avena, centeno, maice, sorgo, entre otros (Schabo et al., 2020). Pero además de los cereales, actualmente se están incorporando una enorme variedad de ingredientes botánicos para obtener aromas diferenciados y potenciar las propiedades funcionales de las cervezas (Borsa et al., 2022). En este sentido se ha evaluado la inclusión de extractos de *Melissae folium*, *Thymi herba*, *Juniperi fructus*, *Urticae radix*, y *Lupuli strobuli* a cervezas comerciales (Djordjevic et al., 2016). Además, se han empleado diversos tipos de frutas como cerezas, moras, naranja, manzana, melocotón, ciruela, etc. para mejorar las propiedades sensoriales y la funcionalidad de cervezas (Nardini & Garaguso, 2020). También se ha evaluado el efecto sobre los compuestos bioactivos de la cerveza tras la adición de nueces, avellanas, cacao, té verde y miel (Nardini & Foddai, 2020). La composición química del mucílago de cacao que contienen entre un 15 y 20% de carbohidratos, de los cuales entre un 6 y 10% son azúcares reductores (Guirlanda et al., 2021) puede suponer una materia prima adecuada para la elaboración de cervezas. En países como Perú se aprovecha el mucílago de cacao en la elaboración de productos tales como licor, mermelada, jaleas, entre otros. Además, la gran cantidad de azúcar que posee el mucílago puede ser la base para la fermentación alcohólica, convirtiéndose en insumo para la elaboración de cerveza artesanal (Pilligua et al.,

2021). El aprovechamiento del mucílago del cacao para la elaboración de diversos alimentos y entre ellos cerveza puede paliar el problema asociado a la generación de este subproducto, ya que los agricultores cacaoteros generalmente desechan el mucílago que se desprende de la semilla de cacao, originando el desperdicio de materia prima. Entre los factores o causas que dan origen al desperdicio del mucílago de cacao se encuentra la falta de conocimientos de los agricultores y la despreocupación de organismos para la optimización de este recurso, desconocimiento del grado de nutrientes y de las propiedades que posee el mucílago y la optimización de este recurso para realizar otro derivado (Arteaga, 2013).

Para el amargor de la cerveza artesanal se utiliza el lúpulo, cuyo papel principal en la elaboración de cerveza es la conservación de los productos provenientes de la isomerización de resinas de cerveza por el lúpulo, el sabor de la cerveza por sus aceites esenciales y productos de isomerización y el aumento de los niveles de polifenoles en el mosto y la cerveza (Aparco et al., 2023). A pesar de que en términos cuantitativos representa un ingrediente menor, la importancia del lúpulo ha ido creciendo en los últimos años, especialmente en las cervezas artesanales por su impacto en el aroma, apariencia y estabilidad (Villacreces et al., 2022). Debido a esto, el incremento en la producción de lúpulo ha sido muy relevante en los últimos años, además de favorecer la comercialización de nuevas variedades que aporten las características aromáticas deseadas (Baiano, 2021; Yan et al., 2019). Entre los diferentes tipos de lúpulo utilizados en la elaboración de cerveza artesanal destacan Northern Brewer, que es utilizado como lúpulo dual proporcionando unas propiedades amargas excelentes de amargor medio, un aroma agradable a hierba y madera (Malting, 2022), y el lúpulo Cascade americano que posee datos 2,3 a 10,2 % AA en pellet, que se caracteriza por un específico aroma cítrico, floral y herbal (Burini, 2017).

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar una cerveza artesanal tipo Ale con dos tipos de lúpulo (Cascade y Northern Brewer) y el uso de mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades Fino de aroma y CCN-51 como sustituto parcial de la malta.

### **V.5.1. Análisis físico-químicos**

En la tabla V.7 se muestran el efecto de la variedad de mucílago, la concentración de mucílago empleada en la formulación y la variedad de lúpulo sobre el pH, % de acidez, sólidos solubles totales, sólidos en suspensión, densidad, espuma y grados alcohólicos.

En general, los parámetros observados se encuentran dentro de las normas de calidad para la cerveza INEN2262 de Ecuador (INEM, 2013) y el Real Decreto 678/2016 español.

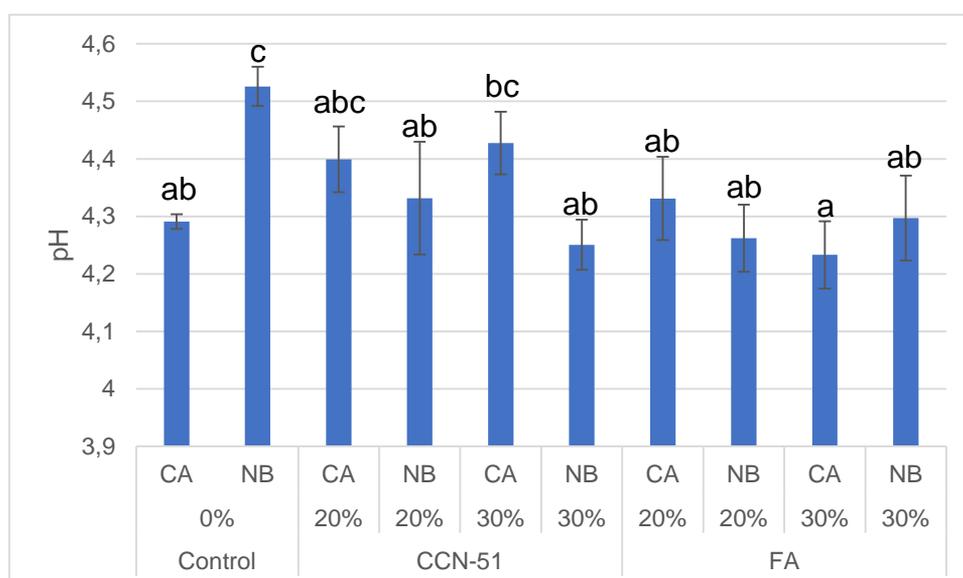
**Tabla V.7.** Efecto de la variedad y concentración del mucílago y variedad de lúpulo sobre el pH, % de acidez, sólidos solubles totales, sólidos en suspensión, densidad, espuma y grados de alcohol de las cervezas artesanales.

<i>Factores</i>	<b>pH</b>		<b>Acidez (%)</b>		<b>Sólidos Solubles Totales (°Brix)</b>		<b>Sólidos en suspensión (%)</b>		<b>Densidad (g/L)</b>		<b>Espuma (cm)</b>		<b>Grados de alcohol (%)</b>	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<i>Variedad de mucílago (V)</i>														
Control	4,41 <sup>b*</sup>	± 0,14	0,39 <sup>a</sup>	± 0,02	5,54 <sup>a</sup>	± 0,52	0,038	± 0,001	1,013 <sup>a</sup>	± 0,014	1,275 <sup>a</sup>	± 0,170	4,29 <sup>a</sup>	± 0,09
CCN-51	4,35 <sup>ab</sup>	± 0,09	0,55 <sup>b</sup>	± 0,10	6,82 <sup>b</sup>	± 1,14	0,022	± 0,007	1,064 <sup>b</sup>	± 0,007	1,375 <sup>a</sup>	± 0,234	8,21 <sup>b</sup>	± 1,20
Fino de Aroma	4,28 <sup>a</sup>	± 0,07	0,49 <sup>b</sup>	± 0,05	5,26 <sup>a</sup>	± 0,40	0,030	± 0,013	1,061 <sup>b</sup>	± 0,003	1,658 <sup>b</sup>	± 0,178	7,72 <sup>b</sup>	± 0,50
<i>Concentración de mucílago (Con)</i>														
0%	4,41	± 0,13	0,39	± 0,02	5,54	± 0,52	0,038	± 0,001	1,013	± 0,014	1,275 <sup>a</sup>	± 0,170	4,29 <sup>a</sup>	± 0,09
20%	4,33	± 0,08	0,50	± 0,09	6,28	± 1,15	0,028	± 0,013	1,062	± 0,006	1,442 <sup>ab</sup>	± 0,299	7,86 <sup>b</sup>	± 1,08
30%	4,31	± 0,09	0,53	± 0,08	5,80	± 1,16	0,024	± 0,008	1,063	± 0,005	1,592 <sup>b</sup>	± 0,167	8,07 <sup>b</sup>	± 0,80
<i>Variedad de lúpulo (L)</i>														
Cascade	4,33	± 0,08	0,47	± 0,06	5,68 <sup>a</sup>	± 0,91	0,028	± 0,009	1,054	± 0,022	1,543	± 0,202	7,53	± 1,61
Northern brewer	4,31	± 0,11	0,53	± 0,11	6,26 <sup>b</sup>	± 1,21	0,027	± 0,012	1,056	± 0,015	1,421	± 0,288	7,35	± 1,58
P-valores														
Pruebas de efectos														
V	<b>0,013</b>		<b>0,046</b>		<b>&lt;0,001</b>		0,072		<b>0,034</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>0,027</b>	
Con	0,278		0,167		0,062		0,414		0,631		<b>0,029</b>		<b>0,046</b>	
L	0,347		0,066		<b>0,025</b>		0,794		0,081		0,105		0,658	
V*Con	0,919		0,584		0,394		0,169		0,978		0,131		0,922	
V*L	<b>0,032</b>		0,081		<b>0,001</b>		0,218		0,979		0,204		0,948	
Con*L	0,824		0,795		0,081		0,557		0,482		<b>0,01</b>		0,501	
V*Con*L	<b>0,030</b>		0,09		0,133		0,436		0,627		0,131		0,58	

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

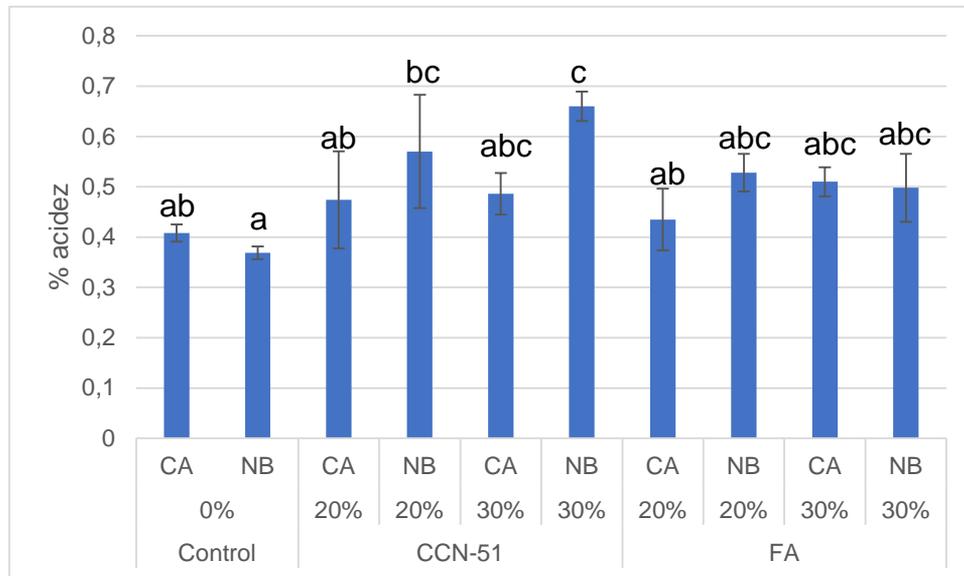
Se puede observar en la tabla V.7 que los valores de pH descendieron cuando se incluyó el mucílago de cacao en la formulación ( $p=0,013$ ), aunque el descenso de pH no se vio afectado por el incremento de mucílago del 20 al 30%. Este descenso del pH estuvo asociado al incremento del % de acidez ( $p=0,046$ ), desde valores medios en las cervezas control de 0,39 hasta 0,49-0,55% con las aplicaciones de mucílago, nuevamente sin influencia del porcentaje de mucílago empleado. Los valores de pH y acidez fueron similares a los observados previamente en cervezas tipo Ale por Cardoso et al. (2021) y Marques et al. (2021).

En la figura V.26 se muestran los valores de pH obtenidos de los lotes de cervezas artesanales preparados con y sin mucílago de cacao. Se puede observar cómo los valores medios de pH se situaron entre 4,2 y 4,5. Además, se observa el efecto de la adición de la variedad de mucílago en el que las cervezas con CCN-51 presentaron pH superiores a 4,3 mientras que las cervezas con mucílago Fino de Aroma presentaron valores inferiores a 4,3. Respecto a los controles sin mucílago, se encontraron diferencias en función del lúpulo, siendo el control con lúpulo Northem brewer el que obtuvo el mayor valor de pH ( $p<0,050$ ).



**Figura V.26.** Valores de pH obtenidos en las cervezas artesanales sin adición de mucilago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northem brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p\leq 0,050$ ).

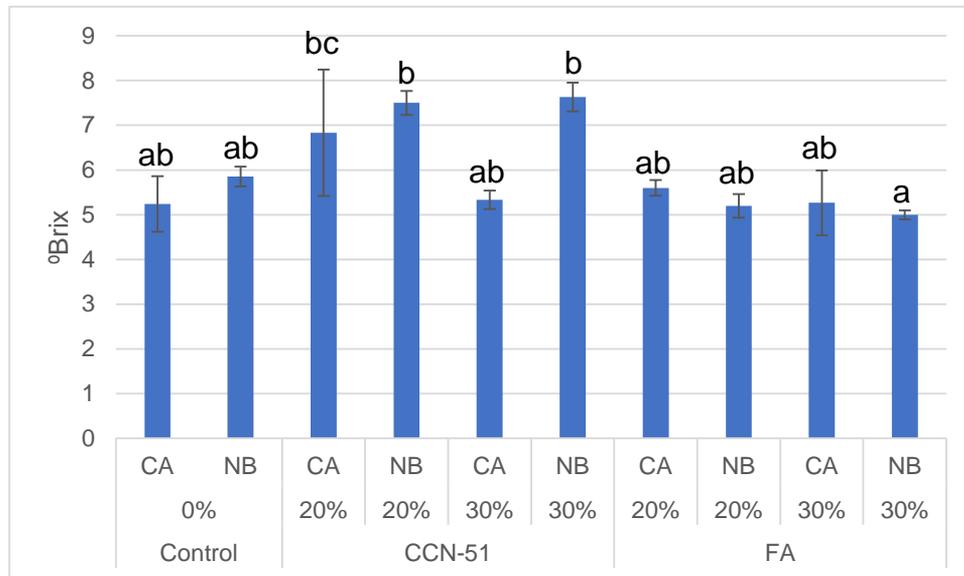
Respecto al porcentaje de acidez, se puede observar en la figura V.27 que los valores se situaron entre 0,36 y 6,6%. En general los controles presentaron menor porcentaje de acidez que las cervezas elaboradas con mucílago. En las cervezas con CCN-51 se obtuvieron valores medios superiores con el lúpulo NB, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,050$ ).



**Figura V.27.** Porcentaje de acidez obtenidos en las cervezas artesanales sin adición de mucilago y con la adición de 20% y 30% de mucilago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

Respecto a los sólidos solubles totales (Tabla V.7), el uso de mucilago de la variedad CCN-51 incremento los valores globales hasta 6,82 °Brix ( $p < 0,001$ ). Igualmente se observó que la inclusión de lúpulo Northern brewer incremento los valores respecto al lúpulo Cascade ( $p = 0,025$ ). Estos valores son similares a los encontrados por Giovenzana et al. (2014), que tras 144 horas de fermentación en cervezas tipo Ale encontraron valores medios de 4,9 °Brix. En cuanto al efecto de la adición de lúpulo, Baiano et al. (2023) observaron un efecto similar cuando compararon la inclusión de Cascade con Columbus, este último con un contenido muy superior de  $\alpha$ -ácidos.

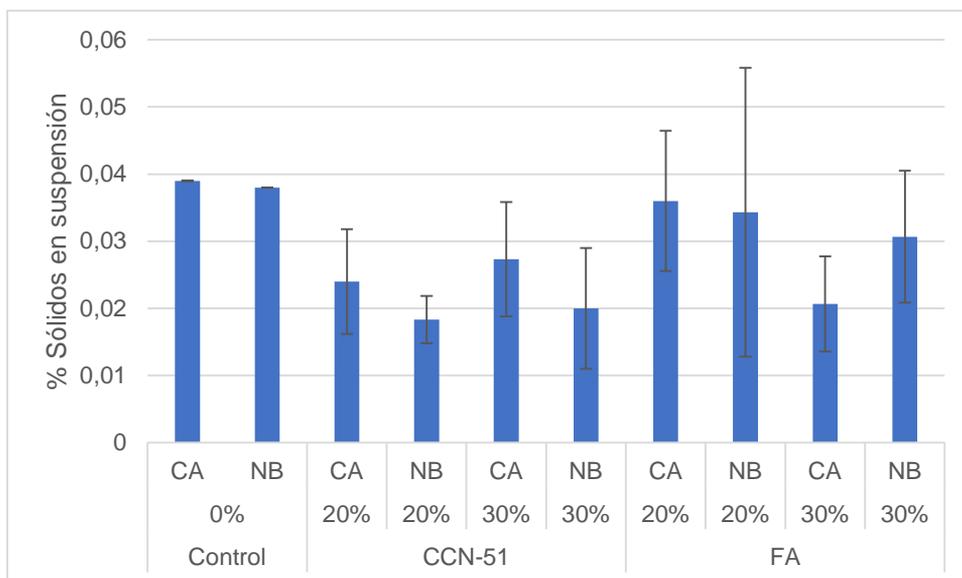
Las cervezas elaboradas con mucilago CCN-51 presentaron contenidos superiores de sólidos solubles totales, con valores superiores a 7 °Brix en la mayoría de los lotes, mientras que las cervezas control y con mucilago Fino de aroma presentaron valores similares (Figura V.278). Esto contrasta con el contenido en sólidos solubles de los mucílagos mostrado en la tabla V.1, en el que CCN-51 presentó valores inferiores a Fino de Aroma.



**Figura V.28.** Contenido en sólidos solubles totales expresado en °Brix obtenidos en las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

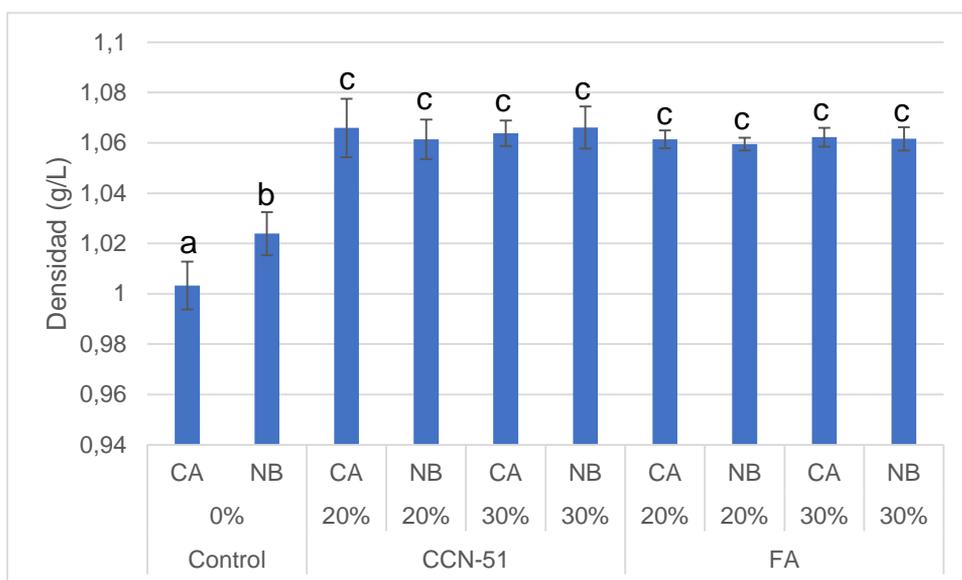
Como se muestra en la tabla V.7 no se observaron efectos de la variedad y concentración de mucílago ni la variedad de lúpulo en los parámetros de sólidos en suspensión ni densidad, con valores medios de 0,22 a 0,38 para los sólidos en suspensión y 1,013 a 1,064 g/L para la densidad. Las densidades obtenidas fueron ligeramente superiores a las observadas por Campos et al. (2021) que emplearon extractos de especias para enriquecer cervezas tradicionales.

No se observaron diferencias significativas en los sólidos en suspensión de las cervezas en ninguno de los lotes ( $p > 0,050$ ), con valores comprendidos entre 0,02 y 0,04% (Figura V.29). Sin embargo, se observó una menor tendencia en el contenido de sólidos en suspensión de las cervezas con CCN-51, en consonancia con los valores obtenidos de ambos mucílagos (Tabla V.1).



**Figura V.29.** Porcentaje de sólidos en suspensión en las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

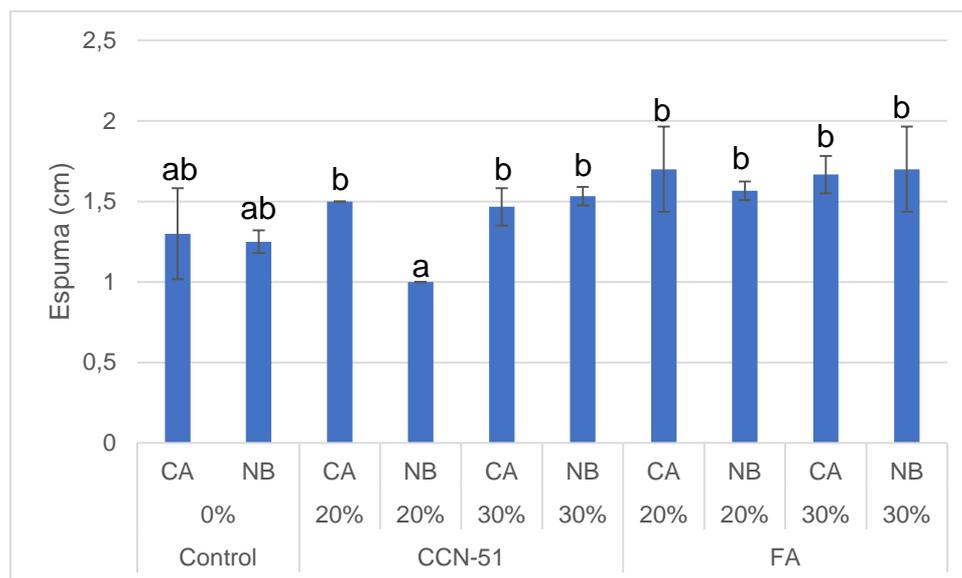
En la figura V.30 se muestra como la densidad se vio afectada por la inclusión de los mucílagos, aunque esta fue independiente de las concentraciones empleadas. Así, los valores de densidad de los controles estuvieron en torno a 1,020 g/L y las cervezas con mucílago presentaron valores en torno a 1,060 g/L ( $p < 0,050$ ).



**Figura V.30.** Densidad (g/L) de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

La producción de espuma estuvo influida por la variedad de mucílago y por la concentración de este ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.7). Así, con el mucílago de la variedad Fino de Aroma se incrementaron los valores medios de espuma desde 1,275 cm del control a 1,658 cm de las cervezas con Fino de Aroma. Además, la cerveza presentó más espuma con la mayor concentración de mucílago ( $p=0,029$ ).

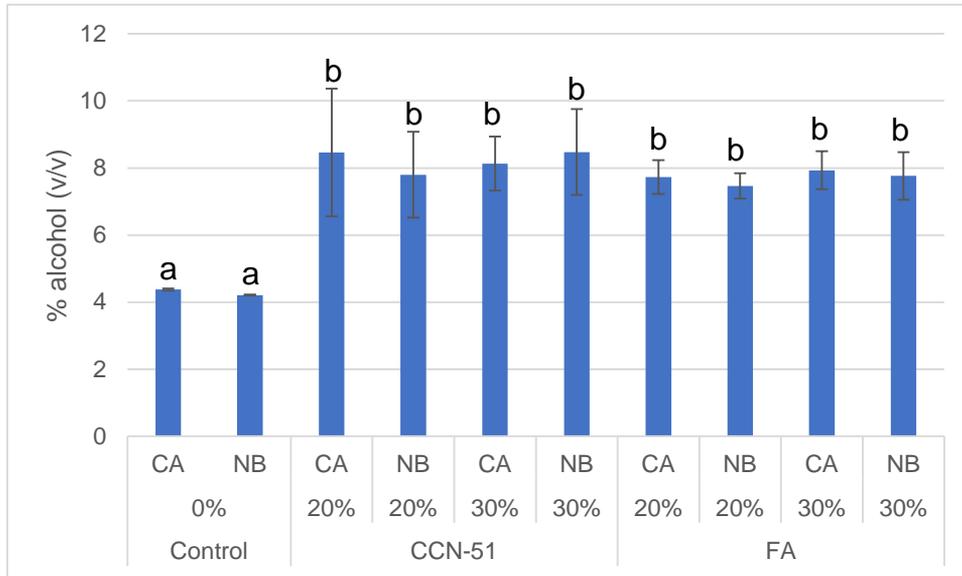
Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, las cervezas con mucílago presentaron valores medios de espuma que las cervezas control, en las que se obtuvieron valores cercanos a 1,3 cm, mientras que la mayoría de los lotes de cervezas con mucílago presentaron valores superiores a 1,5 cm (Figura V.31).



**Figura V.31.** Espuma (cm) de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern Brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

Finalmente, los grados alcohólicos aumentaron de forma notable con la inclusión de mucílago, desde valores medios en los controles de 4,29 % a 8,21 % con el mucílago CCN-51 ( $p=0,027$ ; Tabla V.7). Los valores de los grados alcohólicos del control fueron similares a los obtenidos por Cardoso et al. (2021) con valores superiores al 4%, y por Marques et al. (2017) con valores de 5,88 %.

La inclusión de mucílagos de cacao, independientemente de la variedad y concentración provocó un aumento del % de alcohol cercano al doble encontrado en las cervezas control ( $p < 0,050$ ) tal como se muestra en la figura V.32.



**Figura V.32.** Porcentaje de alcohol (v/v) de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

En la tabla V.8 se muestran los efectos de los factores variedad y concentración de mucílago y variedad de lúpulo sobre las determinaciones de amargor, absorbancia y transmitancia, turbidez, y los parámetros colorimétricos  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .

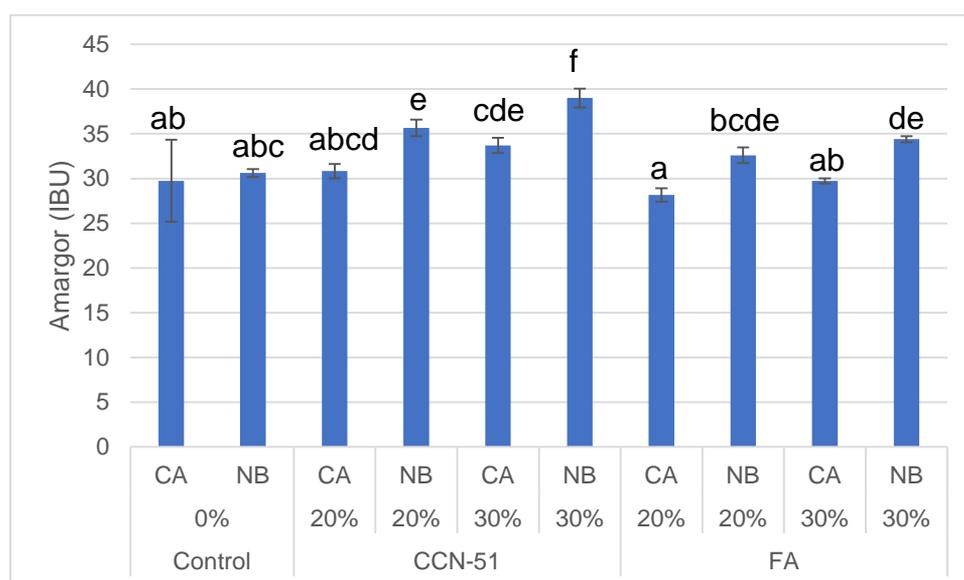
**Tabla V.8.** Efecto de la variedad y concentración del mucílago y variedad de lúpulo sobre el amargor, absorbancia y transmitancia, turbidez, y los parámetros colorimétricos L\*, a\* y b\* de las cervezas artesanales.

<i>Factores</i>	<b>Amargor (IBU)</b>		<b>Absorbancia</b>		<b>Transmitancia</b>		<b>Turbidez (NTU)</b>		<b>Luminosidad (L*)</b>		<b>Color rojo (a*)</b>		<b>Color amarillo (b*)</b>	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<i>Variedad de mucílago (V)</i>														
Control	30,1 <sup>a*</sup>	± 2,7	0,77	± 0,45	10,2	± 3,6	11,1	± 1,19	39,5 <sup>a</sup>	± 1,2	19,0 <sup>a</sup>	± 1,7	39,3 <sup>a</sup>	± 2,4
CCN-51	34,8 <sup>b</sup>	± 3,2	0,90	± 0,15	13,0	± 4,5	8,1	± 2,14	40,8 <sup>a</sup>	± 3,0	22,2 <sup>b</sup>	± 2,5	41,0 <sup>ab</sup>	± 5,5
Fino de Aroma	31,2 <sup>a</sup>	± 2,5	0,93	± 0,27	13,7	± 7,4	9,2	± 3,69	47,1 <sup>b</sup>	± 4,8	19,1 <sup>a</sup>	± 3,0	47,7 <sup>b</sup>	± 5,7
<i>Concentración de mucílago (Con)</i>														
0%	30,1 <sup>a</sup>	± 2,7	0,77	± 0,45	10,2 <sup>a</sup>	± 3,6	11,1	± 1,19	39,5	± 1,2	19,0	± 1,7	39,3	± 2,4
20%	31,8 <sup>b</sup>	± 2,9	0,95	± 0,19	12,1 <sup>ab</sup>	± 4,4	8,89	± 3,50	43,1	± 3,8	20,4	± 2,9	43,4	± 6,8
30%	34,2 <sup>c</sup>	± 3,4	0,88	± 0,24	14,7 <sup>c</sup>	± 7,3	8,41	± 2,54	44,8	± 6,1	20,8	± 3,6	45,3	± 6,3
<i>Variedad de lúpulo (L)</i>														
Cascade	30,4 <sup>a</sup>	± 2,4	0,92	± 0,31	11,4	± 5,1	9,10	± 2,05	41,5 <sup>a</sup>	± 4,2	21,2	± 2,7	42,8	± 6
Northem brewer	34,7 <sup>b</sup>	± 2,9	0,87	± 0,19	14,5	± 6,3	8,91	± 3,69	45,1 <sup>b</sup>	± 5,2	19,6	± 3,3	44,5	± 6,7
P-valores														
Pruebas de efectos														
V	<b>&lt;0,001</b>		0,782		0,592		0,284		<b>&lt;0,001</b>		<b>0,012</b>		<b>0,01</b>	
Con	<b>&lt;0,001</b>		0,427		<b>0,059</b>		0,638		0,276		0,761		0,418	
L	<b>&lt;0,001</b>		0,502		0,088		0,833		<b>0,042</b>		0,224		0,767	
V*Con	0,203		0,558		0,273		0,212		0,413		0,404		0,612	
V*L	0,636		0,001		<b>&lt;0,001</b>		0,288		0,702		0,378		0,368	
Con*L	0,748		0,432		0,399		0,423		0,935		0,368		0,736	
V*Con*L	0,915		0,113		<b>0,002</b>		<b>0,003</b>		0,425		0,689		0,670	

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

El amargor medio de las cervezas según los factores estuvo comprendido entre 30,1 y 34,8 IBU. La variedad y concentración de mucílago y la variedad de lúpulo influyeron significativamente en los resultados ( $p \leq 0,050$ ; Tabla V.8). Las cervezas con mucílago CCN-51, con mayor porcentaje de mucílago y con el lúpulo Northem brewer presentaron los mayores valores de amargor. Marques et al. (2017) observó un amargor en cervezas Ale comerciales de 40,9 unidades IBU, superiores a las obtenidas en el presente trabajo, aunque no se especificó el tipo de lúpulo ni su concentración.

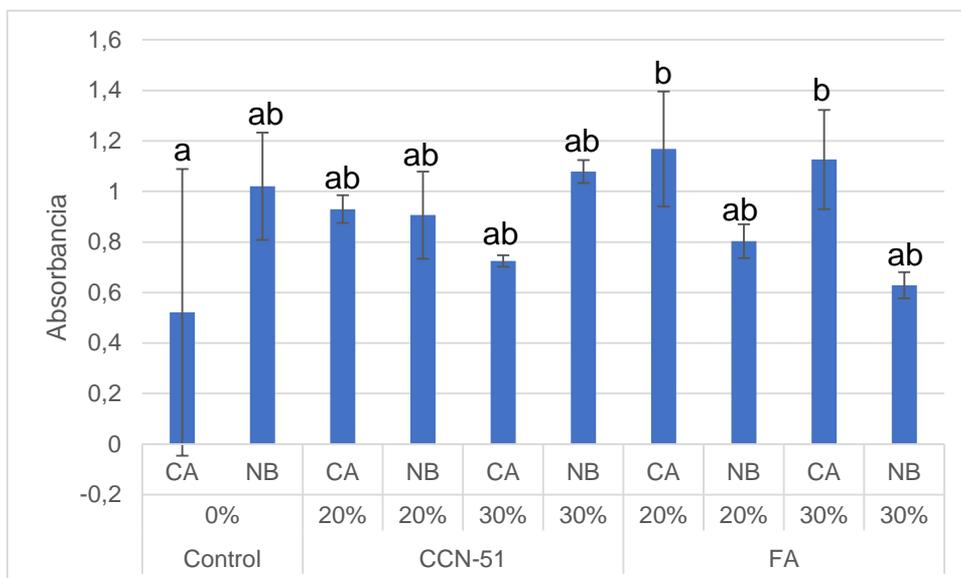
Como se muestra en la figura V.33 el amargor presentó diferencias significativas en función del mucílago, la concentración del mucílago y la variedad de lúpulo. En general las cervezas con CCN-51 presentaron mayor amargor que las Fino de Aroma, incrementándose con el aumento de concentración del mucílago. La inclusión de lúpulo NB aportó mayores unidades IB ( $p < 0,050$ ).



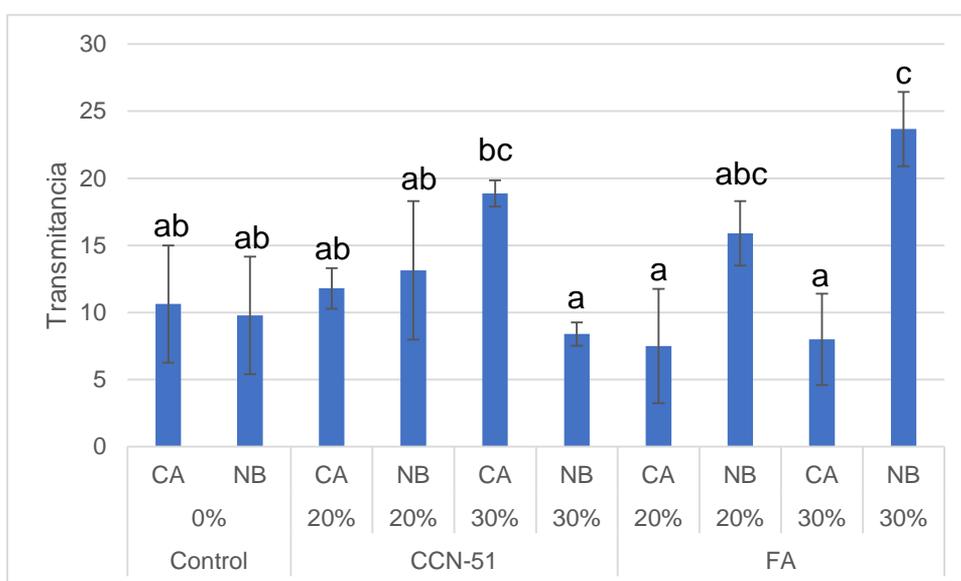
**Figura V.33.** Amargor (unidades IB) de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northem brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

En cuanto a los valores de absorbancia y transmitancia, se observó que en general no se presentaron cambios en función de los factores con la excepción de la concentración de mucílago en la que se observó una mayor transmitancia con 30% de mucílago ( $p = 0,059$ ; Tabla V.8). Por su parte, la turbidez de las cervezas permaneció significativamente igual tras el análisis de los factores.

En las figuras V.34 y V.35 se muestran los valores de absorbancia y transmitancia de las cervezas artesanales elaboradas. Se puede observar que los valores medios de ambos parámetros fueron muy dispersos, con valores para la absorbancia a 430 nm entre 0,5 y 1,2, aunque en general no se observaron diferencias significativas asociadas a ningún factor. Respecto a la transmitancia, los valores se situaron entre 7 y 23 unidades. En general, el aumento de concentración de mucílago aumentó la transmitancia.

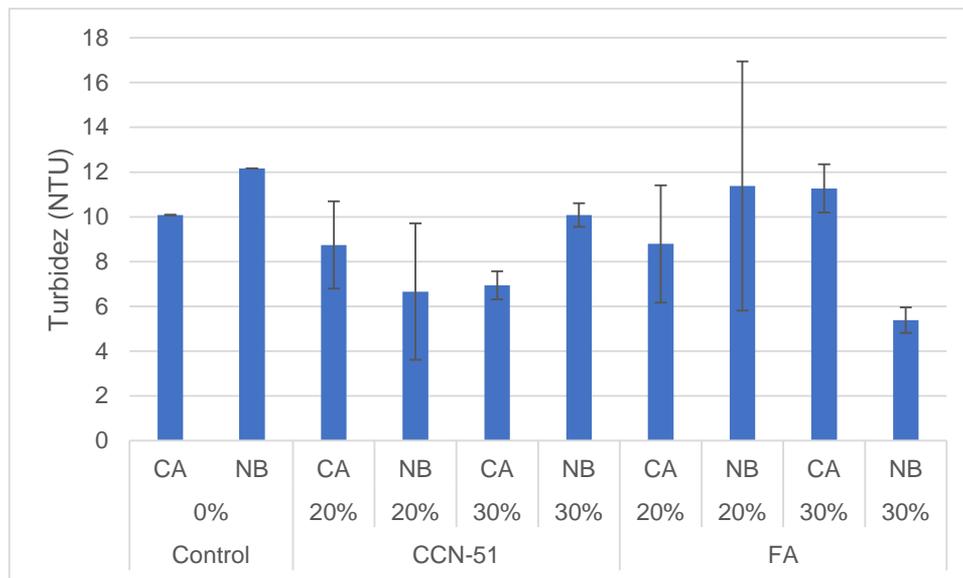


**Figura V.34.** Absorbancia (430 nm) de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).



**Figura V.35.** Transmitancia (430 nm) de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

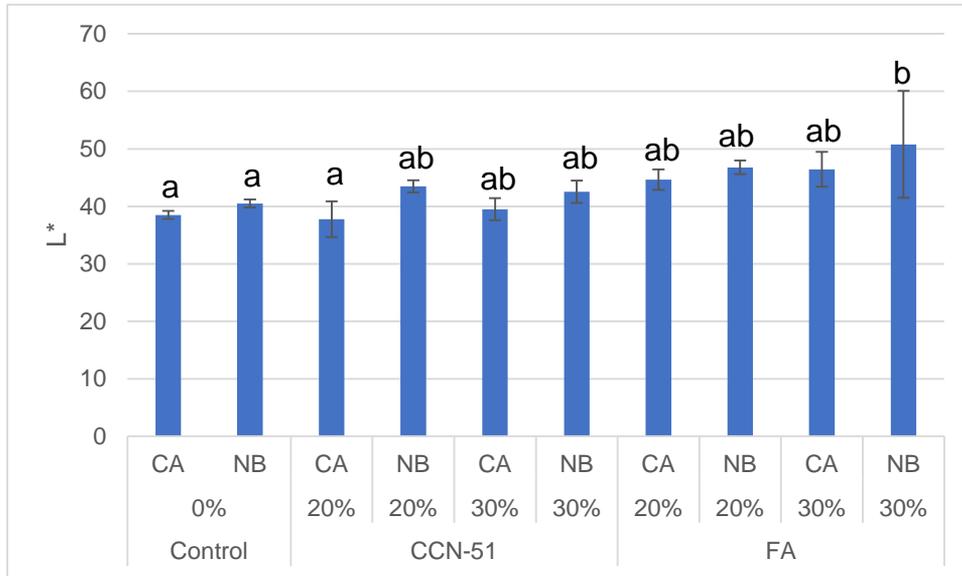
Los resultados de los valores de turbidez de los diferentes lotes de cerveza no mostraron diferencias significativas ( $p=0,055$ ), con valores comprendidos entre 5,3 y 12,1 unidades NT (Figura V.36).



**Figura V.36.** Turbidez, expresado en unidades NT, de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

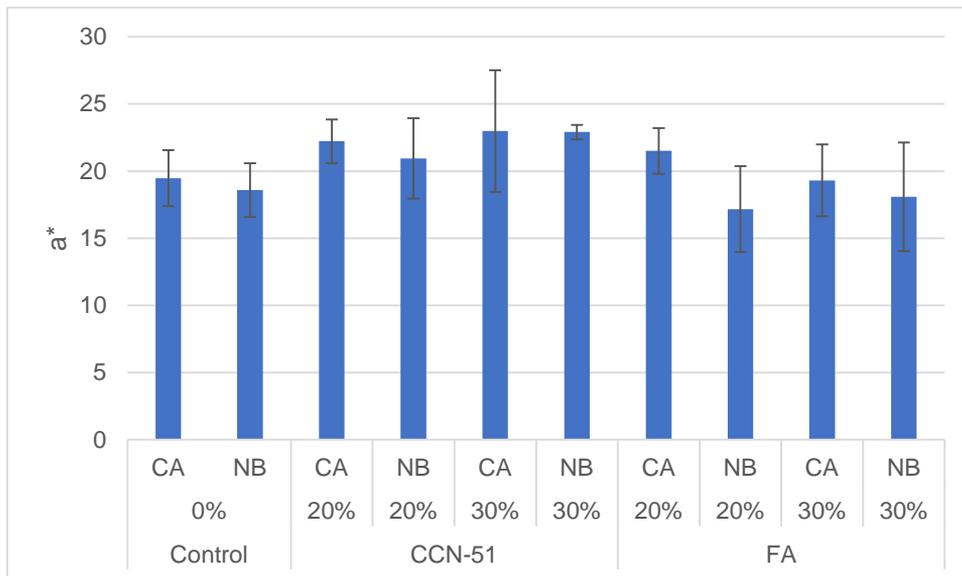
En cuanto a los parámetros colorimétricos, la variedad de mucílago influyó en la luminosidad, color rojo y color amarillo, mientras que la variedad de lúpulo en la luminosidad. Las cervezas con CCN-51 mostraron mayor luminosidad y color amarillo, mientras que las cervezas con Fino de Aroma presentaron un mayor color rojo ( $p \leq 0,050$ ). Además, se observó que la inclusión de lúpulo Northern brewer aumentó la luminosidad de las cervezas. El método más extendido para evaluar el color de la cerveza se basa en el sistema EBC (European Brewery Convention). Las coordenadas de color situarían a las cervezas control y con CCN-51 en unos valores en torno a las 26 EBC, correspondientes a colores dorados oscuros, mientras que las cervezas elaboradas con Fino de Aroma responderían a una valoración en torno a los 20 EBC, con coloraciones doradas más claras. La adición de nuevos ingredientes modifica sensiblemente los parámetros de color en la cerveza como ponen de manifiesto Wang et al. (2022).

Las luminosidades de las cervezas elaboradas se situaron entre las 38 y 51 unidades tal y como se muestra en la figura V.37. Se puede observar como en general las cervezas con Fino de Aroma, mayor concentración de mucílago y lúpulo NB presentaron mayores luminosidades.



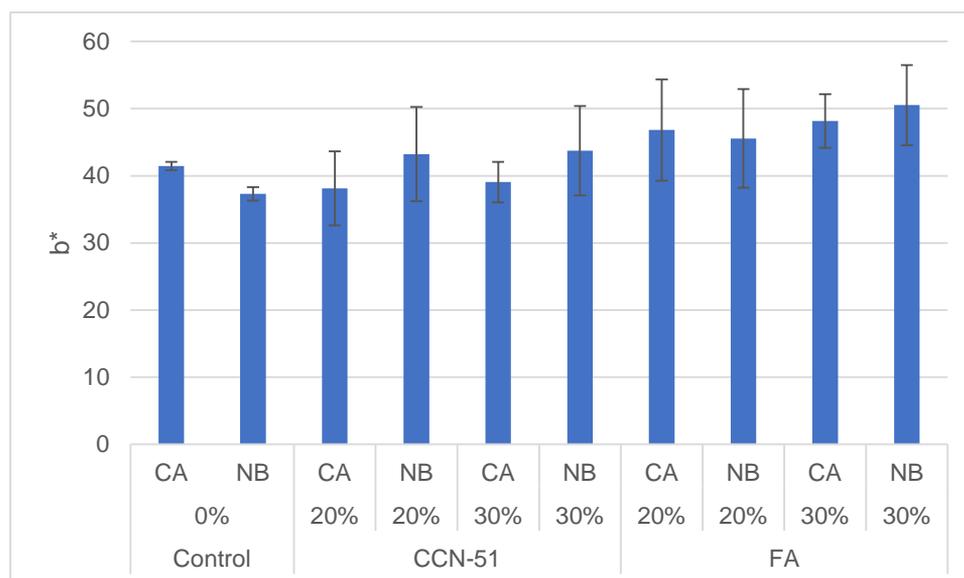
**Figura V.37.** Luminosidad ( $L^*$ ) de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

Respecto al color rojo ( $a^*$ ), no se observaron diferencias significativas entre lotes ( $p > 0,050$ ; Figura V.38); sin embargo, las tendencias de los valores medios muestran mayores valores de color rojo en la variedad de mucílago CCN-51, y con el lúpulo Cascade. La caracterización del mucílago (Tabla V.1) permitió determinar unos valores de color rojo que doblaban en CCN-51 respecto Fino de Aroma, que podrían explicar esta tendencia.



**Figura V.38.** Turbidez, expresado en unidades NT, de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

Respecto a las coloraciones amarillas (Figura V.39), los resultados mostraron tendencias opuestas al color rojo, ya que los valores medios fueron superiores en las cervezas con Fino de Aroma y con el lúpulo NB. La influencia del mucílago en el color amarillo sobre la cerveza puede estar asociada a los valores encontrados de color amarillo en la caracterización de los mucílagos (Tabla V.1.).



**Figura V.39.** Turbidez, expresado en unidades NT, de las cervezas artesanales sin adición de mucílago y con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

### V.5.2. Análisis microbiológicos

Aunque las cervezas son un ambiente desfavorable para el desarrollo de microorganismos, algunos microorganismos alterantes de la cerveza pueden desarrollarse (Anderson et al., 2019). Para los microorganismos que pueden estar presentes durante el proceso de elaboración de la cerveza, tales como BAL, *Pediococcus*, bacterias acéticas y levaduras (Spitaels et al., 2014), el proceso de detección más empleado se basa en la siembra en medios de cultivo, para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas, o finalmente mediante pruebas moleculares (Reyes et al.; Las cervezas elaboradas mostraron ausencia de microorganismos aerobios totales y patógenos como *E. coli* y *Salmonella* en todas las elaboraciones.

### V.5.3. Análisis sensorial

En la tabla V.9 se muestra el resultado del análisis sensorial de las cervezas formuladas con mucílago de las dos variedades a las concentraciones de 20 y 30%.

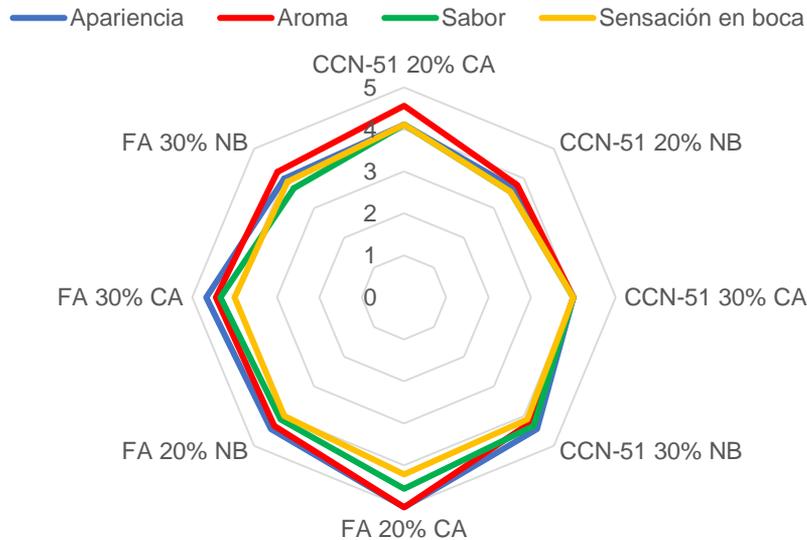
**Tabla V.9.** Efecto de la variedad y concentración del mucílago y variedad de lúpulo sobre el análisis sensorial de las cervezas artesanales.

<i>Factores</i>	<i>Apariencia</i>		<i>Aroma</i>		<i>Sabor</i>		<i>Sensación en boca</i>	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<i>niveles</i>								
<i>Variedad de mucílago (V)</i>								
CCN-51	4,06 <sup>a*</sup>	± 1,14	4,14	± 0,96	4,00	± 0,98	3,94	± 0,89
Fino de Aroma	4,53 <sup>b</sup>	± 0,84	4,50	± 0,81	4,17	± 1,13	4,03	± 1,05
<i>Concentración de mucílago (Con)</i>								
20%	4,31	± 1,06	4,42	± 0,91	4,08	± 0,99	3,97	± 0,97
30%	4,28	± 1,01	4,22	± 0,89	4,08	± 1,13	4,00	± 0,98
<i>Variedad de lúpulo (L)</i>								
Cascade	4,44	± 0,87	4,50	± 0,51	4,25	± 0,84	4,08	± 0,82
Northern brewer	4,14	± 1,15	4,14	± 1,12	3,92	± 1,22	3,89	± 1,11
<i>P-valores</i>								
<i>Pruebas de efectos</i>								
V	<b>0,048</b>		0,085		0,508		0,726	
Con	0,906		0,35		1		0,907	
L	0,197		0,085		0,188		0,414	
V*Con	0,128		0,504		0,188		0,414	
V*L	0,197		0,688		0,378		0,907	
Con*L	0,41		0,085		0,508		0,414	
V*Con*L	0,29		0,504		0,271		0,559	

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

Los resultados mostraron una aceptación muy elevada de las cervezas elaboradas con mucílago de cacao, con diferencias significativas limitadas al tipo de mucílago en cuanto a la apariencia, siendo mejor valorada la cerveza con mucílago Fino de Aroma con valoraciones medias de 4,53 sobre 5, mientras que CCN-51 las valoraciones medias se situaron en 4,06 ( $p=0,048$ ). En el resto de los atributos examinados como son sabor, aroma y sensación en boca no se observaron diferencias, obteniendo valoraciones cercanas o superiores a 4 sobre 5 independientemente de la variedad de mucílago, la concentración o el tipo de lúpulo utilizado. Se puede destacar que en todos los atributos las valoraciones medias fueron superiores para las cervezas con Fino de Aroma y con lúpulo Cascade, aunque como se ha indicado anteriormente sólo se encontraron las diferencias estadísticas en la apariencia cuando se compararon CCN-51 con Fino de Aroma.

En la figura V.40 se muestra un diagrama radial de las puntuaciones sensoriales de todos los lotes elaborados con mucílago de cacao. Nuevamente se constata la elevada aceptación de todos los lotes de cerveza con mucílago. En este caso no se encontró ninguna diferencia significativa entre lotes ( $p > 0,050$ ), aunque las puntuaciones medias más altas de los cuatro atributos elaborados se otorgaron a las cervezas elaboradas con 20% de mucílago Fino de Aroma y lúpulo Cascade.



**Figura V.40.** Valoraciones medias sensoriales de apariencia, aroma, sabor, y sensación en boca de las cervezas artesanales con la adición de 20% y 30% de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma (FA) combinados con la adición de los lúpulos Cascade (CA) y Northern brewer (NB). Valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,050$ ).

Por lo tanto, esta investigación pone de manifiesto la viabilidad de emplear el mucílago de cacao como insumo para la elaboración de cervezas artesanales.

## V.6. Bioconservación de las carnes

La carne es un alimento nutritivo gracias a sus propiedades biológicas y composición química, entre las que se distinguen un alto contenido de proteínas, pH ligeramente ácido y una elevada actividad de agua. Todo ello la convierte en un excelente ambiente para el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias, que participan activamente en su alteración. El perfil microbiológico de la carne fresca, responsable principal de su alteración, es la suma de las aportaciones durante las operaciones de faena, condiciones de almacenamiento, transporte y distribución (Signorini, 2007). Además de la alteración microbiológica existen causas externas que contribuyen a la descomposición de la carne como la temperatura, humedad, luz, oxígeno y tiempo.

La microflora de la carne es usualmente dominada por las bacterias ácido-lácticas (BAL), que ejercen un efecto modificador en la microflora de la carne (Flores et al., 2011). Además de las BAL, en los procesos de alteración de la carne se han identificado especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Buttiauxella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, entre otras (Doulgeraki et al., 2012). La carne cruda, además de ser altamente susceptible a deterioro, también puede constituir un vehículo para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Durante el sacrificio y procesamiento, todos los tejidos potencialmente comestibles pueden estar sujetos a contaminación por diversas fuentes, ya sea interna o externa al animal (Heredia et al., 2014). Uno de los mayores riesgos sanitarios asociados con el consumo de carne reside en la posibilidad de que este alimento sea

vehículo de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Omer et al., 2018).

Los atributos organolépticos son de gran importancia para el consumidor cuando se habla de carne fresca como: el color (intensidad y coloración), la jugosidad, la apariencia (grasa intramuscular, exudación), el sabor y el aroma (Adamski et al., 2017; Aaslyng et al., 2007); mientras que la industria centra más la atención en factores como pH, la capacidad de retención de agua (CRA), textura, estabilidad oxidativa y ausencia de sabores anómalos. Estos atributos están influenciados por factores como la raza, la edad, la dieta, el manejo ante mortem, los procesos de matanza y las prácticas de manejo post mortem (Tougan et al., 2013). Todos estos atributos deben ser mantenidos dentro de unos márgenes durante la vida útil de la carne, para lo cual se utilizan diferentes técnicas de conservación y/o prolongación de la vida útil.

Entre las alternativas para prolongar la vida útil de los alimentos se encuentra la *Bioconservación o biopreservación*, que no es más que un método de conservación en el que se usan sustancias naturales provenientes de bacterias, hongos, plantas y animales para mantener la vida útil de los alimentos mientras garantizan su seguridad (Barcenilla et al., 2022; Bibek, 2018; Pisoschi et al., 2018). La bibliografía muestra múltiples aplicaciones de extractos fenólicos obtenidos de diferentes productos vegetales tal y como muestra la revisión de Munekata et al. (2020), en los que las principales aportaciones son el retraso de las reacciones de oxidación, los cambios de color y los cambios sensoriales. Los recubrimientos comestibles también constituyen una interesante opción para mejorar la conservabilidad de la carne, en los que la inclusión de componentes bioactivos permite mejorar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los recubrimientos (Umaraw & Verna, 2017). La biopreservación de la carne mediante la aplicación de microorganismos es una técnica ampliamente investigada como demuestran las recientes revisiones de Barcenilla et al. (2022), Bhattacharya et al. (2022) y Kaveh et al. (2023), en las que se destaca la idoneidad de las BAL para este fin. Las BAL desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, por su contribución significativa a las características sensoriales, tecnológicas, valor nutricional, propiedades funcionales y seguridad de diversos productos alimentarios (Ayivi et al., 2020). Las BAL son usadas en la biopreservación como cultivos bioprotectores ya que su capacidad de producir ácido láctico y otros metabolitos, contrarrestan el crecimiento de bacterias no deseadas, ayudando a preservar el alimento (Fiorentini et al., 2001). Entre los metabolitos producidos por las BAL, las bacteriocinas y sus cepas productoras pueden ser utilizadas para mejorar la calidad y conservación de los alimentos. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por microorganismos, principalmente activos frente a microorganismos taxonómicamente emparentados, generalmente bacterias Gram positivas en el caso de las BAL (Parada et al., 2007). Pero, además, las BAL tienen la capacidad de inhibir a bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Salmonella* mediante la producción de los ácidos orgánicos y otros metabolitos (Volzing et al., 2013).

El origen de las BAL empleadas en la bioconservación puede ser diverso, y estas, a su vez, pueden ser aplicadas directamente como cultivos purificados o mediante el empleo de materias fermentadas que las vehiculen. Este es el caso del mucílago del cacao. Durante la obtención del mucílago de cacao, ocurre una fermentación aeróbica tras la separación de la vaina, conducida fundamentalmente por levaduras, BAL y bacterias acéticas (Almeida et al., 2020; de Vuyst & Leroy, 2020). El mucílago que rodea el grano de cacao se degrada por la acción de los microorganismos del medio ambiente natural (Rojo-Poveda et al., 2020), con la

producción de metabolitos tales como etanol y ácidos orgánicos como el acético, cítrico, láctico, y oxálico (Amorim et al., 2017). Las bacterias ácido-lácticas presentes en el mucílago de cacao producen bacteriocinas (Nandha & Sukla, 2023; Vallejo et al., 2018), brindando la oportunidad de ser utilizado como conservante alargando la vida útil de las carnes (Morante-Carriel et al., 2023).

#### **V.6.1. Parámetros físico-químicos**

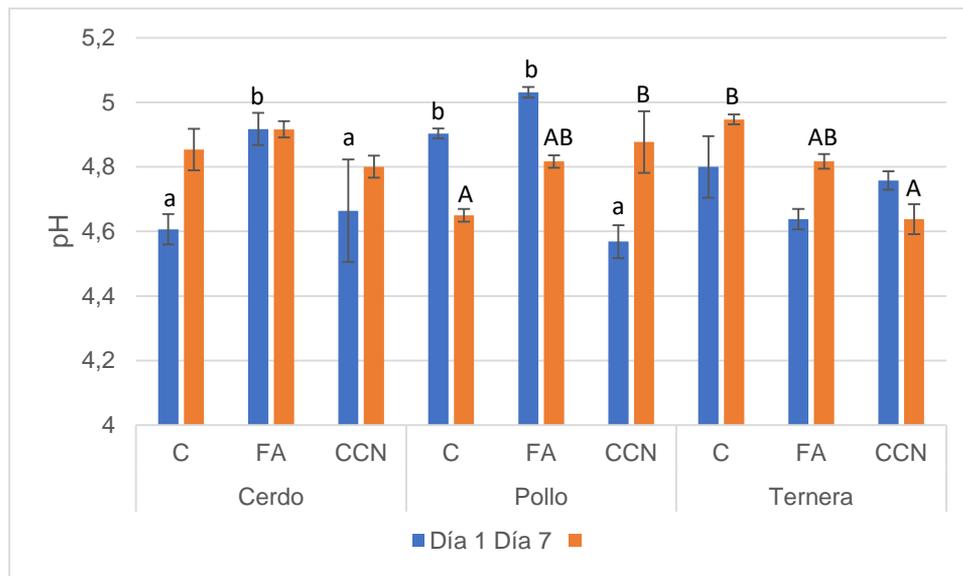
En la tabla V.10 se muestra el efecto de los factores tipo de carne (cerdo, pollo, ternera), la variedad de mucílago de cacao (control, Fino de Aroma, y CCN-51) y el tiempo de conservación (1 día y 7 días) de las carnes almacenadas a 4°C sobre los parámetros físico-químicos de la carne.

**Tabla V.10.** Efecto de los factores carne, variedad de mucílago y tiempo de conservación sobre los parámetros físico-químicos de la carne de cerdo, pollo y ternera.

<i>Factores</i>	<b>pH</b>		<b>Acidez (% a. láctico)</b>		<b>Humedad (%)</b>		<b>CRA (%)</b>		<b>Dureza (N)</b>		<b>Luminosidad (L*)</b>		<b>Color rojo (a*)</b>		<b>Color amarillo (b*)</b>	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<i>Carne (C)</i>																
Cerdo	4,78	± 0,14	0,143	± 0,02	71,48 <sup>a</sup>	± 3,47	15,78	± 5,08	1,41	± 0,57	51,55 <sup>b</sup>	± 8,75	4,75 <sup>b</sup>	± 1,19	11,51 <sup>a</sup>	± 1,70
Pollo	4,81	± 0,16	0,141	± 0,017	73,33 <sup>b</sup>	± 3,37	14,38	± 5,06	1,72	± 0,88	53,05 <sup>b</sup>	± 10,72	3,92 <sup>a</sup>	± 3,93	16,91 <sup>b</sup>	± 5,02
Ternera	4,77	± 0,12	0,141	± 0,023	72,01 <sup>ab</sup>	± 2,85	13,54	± 3,64	1,48	± 0,65	46,02 <sup>a</sup>	± 7,48	6,01 <sup>c</sup>	± 1,44	10,66 <sup>a</sup>	± 2,40
<i>Variedad mucílago (V)</i>																
Control	4,79 <sup>b*</sup>	± 0,14	0,130 <sup>a</sup>	± 0,017	70,87 <sup>a</sup>	± 1,71	11,47 <sup>a</sup>	± 1,75	2,05 <sup>b</sup>	± 0,53	45,95 <sup>a</sup>	± 8,02	5,61 <sup>b</sup>	± 1,62	11,98 <sup>a</sup>	± 1,54
CCN51	4,72 <sup>a</sup>	± 0,19	0,156 <sup>b</sup>	± 0,016	72,59 <sup>ab</sup>	± 3,48	16,54 <sup>b</sup>	± 3,62	1,16 <sup>a</sup>	± 0,46	52,78 <sup>b</sup>	± 7,49	3,94 <sup>a</sup>	± 1,87	13,28 <sup>b</sup>	± 5,58
Fino de Aroma	4,85 <sup>c</sup>	± 0,13	0,138 <sup>a</sup>	± 0,017	73,37 <sup>b</sup>	± 4,06	15,68 <sup>b</sup>	± 5,98	1,38 <sup>a</sup>	± 0,80	51,89 <sup>b</sup>	± 10,64	5,14 <sup>b</sup>	± 2,59	13,79 <sup>b</sup>	± 4,83
<i>Tiempo de almacenamiento (T)</i>																
1 día	4,76 <sup>a</sup>	± 0,16	0,145	± 0,022	71,60 <sup>a</sup>	± 3,38	14,74	± 5,18	1,58	± 0,77	50,65	± 8,75	5,40 <sup>b</sup>	± 1,87	12,61 <sup>a</sup>	± 3,17
7 días%	4,8 <sup>b</sup>	± 0,14	0,138	± 0,016	72,95 <sup>b</sup>	± 3,08	14,39	± 5,15	1,49	± 0,68	49,77	± 11,32	4,39 <sup>a</sup>	± 2,32	13,43 <sup>b</sup>	± 5,33
P-valores																
<i>Pruebas de efectos</i>																
C	0,115		0,909		0,043		0,263		0,312		<0,001		<0,001		<0,001	
V	<0,001		<0,001		0,005		0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
T	0,005		0,055		0,028		0,754		0,616		0,406		<0,001		0,006	
C*V	0,015		0,001		0,001		0,178		0,729		<0,001		<0,001		<0,001	
C*T	<0,001		0,597		0,679		0,424		0,437		<0,001		<0,001		<0,001	
V*T	<0,001		0,043		<0,001		0,456		0,525		0,688		<0,001		<0,001	
C*V*T	<0,001		0,014		0,021		0,407		0,339		<0,001		<0,001		<0,001	

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

Los resultados mostraron que las carnes no presentaron diferencias a nivel de pH como se observa en la tabla V.10 ( $p=0,115$ ), pero si se modificó en las medias globales en función de la variedad de mucílago y el tiempo de muestreo. Los pHs observados fueron especialmente bajos, síntoma de una posible baja calidad higiénica de las carnes utilizadas (Signorini, 2007). Este bajo pH puede influir en otros parámetros, ya que se ha observado que la CRA disminuye a bajos pH y con ello aumenta la dureza de las carnes (Pethick et al., 2005), además de influir en el color de la carne (Hamoen et al., 2013). La aplicación de mucílago tuvo un efecto global sobre el pH desigual, ya que la aplicación de Fino de Aroma provocó los pH medios estadísticamente superiores ( $p<0,050$ ), mientras que CCN-51 los menores. Los resultados del análisis de los lotes de carnes respecto al pH en los diferentes tipos de carnes con la aplicación de mucílago de dos variedades de cacao y dos tiempos de conservación se muestran en la figura V.41. En cuanto a los valores de pH observados en el cerdo, tras 1 día a 4°C se observó un valor de 4,61, que aumentó a 4,85 a los 7 días de conservación. La aplicación de mucílago Fino de Aroma modificó significativamente el pH tras su aplicación y tras 7 días de almacenamiento (4,92;  $p<0,050$ ), mientras que la aplicación de mucílago CCN-51 conservó los valores de pH iniciales tras 7 días, sin diferencias con el control ( $p>0,050$ ). Respecto al pH del pollo, sólo se observaron diferencias tras 1 día de almacenamiento con el tratamiento con CCN-51, en el que descendió el pH presente en el control de 4,90 a valores de 4,56. Tras 7 días de almacenamiento, los valores del pollo control descendieron hasta 4,65, siendo significativamente inferior al tratamiento con CCN-51 que presentó valores con 4,88 ( $p<0,050$ ). Finalmente, en el pH de la ternera se observaron diferencias entre tratamientos a los 7 días de almacenamiento, en los que la ternera control presentó los mayores valores y la tratada con mucílago CCN-51 los menores ( $p<0,050$ ).

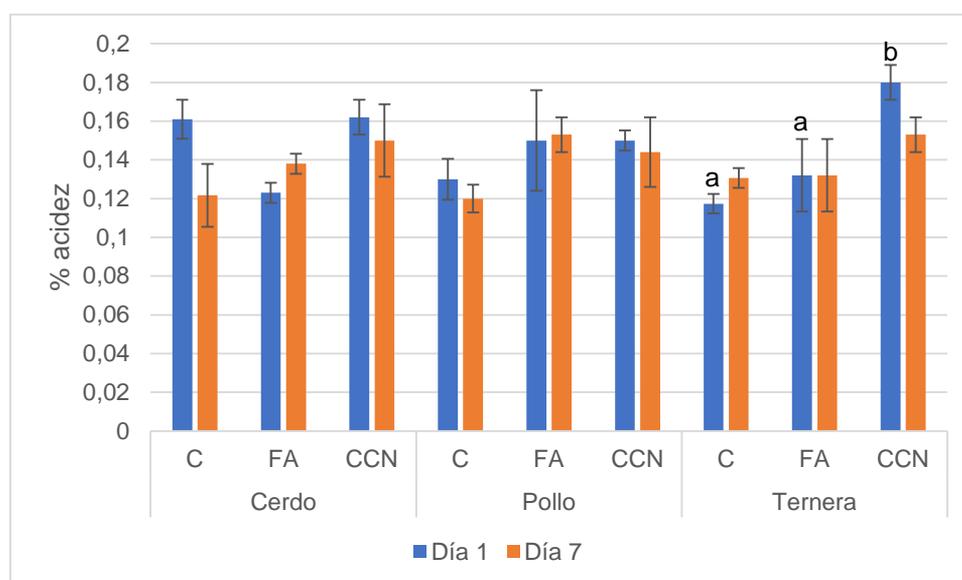


**Figura V.41.** pH de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

En general, los valores de pH observados en este trabajo fueron inferiores a los mostrados en la bibliografía, como los mostrados por Perlo (2020) para carne de pollo, aunque se encuentran cercanos a los valores indicados por la norma NTE 2346 sobre Carne y

menudencias comestibles de animales de abasto (INEN, 2015). En cuanto al efecto del mucílago, la aplicación de BAL aisladas de mucílago de cacao CCN-51 y Fino de Aroma a carne de ternera no modificó los valores de pH, aunque los autores observaron un valor de pH de la carne muy superior al observado en este trabajo (Morante-Carriel et al., 2023). Otros trabajos orientados a la biopreservación de las carnes como el realizado por Behbahani et al. (2021) y Noshad et al. (2021) empleando formulaciones que incluía mucílago de *Lepidium perfoliatum* y de *Plantago major* respectivamente mostraron pequeñas modificaciones en el pH de carnes de ternera y búfalo.

Como se observa en la tabla V.10, las carnes presentaron porcentajes de acidez medios estadísticamente iguales. El periodo de muestreo tampoco presentó diferencias significativas, mientras que la variedad de mucílago sí influyó de forma significativa ( $p < 0,001$ ). Además, se observaron interacciones significativas entre los factores carne y variedad de mucílago, variedad de mucílago y día de conservación, y entre los tres factores. En cuanto a los resultados del porcentaje de acidez, en general no se observaron diferencias entre tratamientos y días de conservación (Figura V.42), excepto en el caso de la ternera. Los valores de acidez de la carne de cerdo se situaron en torno a 0,13-0,15%; la carne de pollo en torno a 0,14-0,15; y la ternera en el rango 0,12-0,18%. Hay que señalar que el tratamiento con mucílago Fino de Aroma en la ternera aumentó los valores de acidez significativamente respecto al control tras 7 días de almacenamiento ( $p < 0,050$ ). Los valores de acidez fueron similares a los observados por León (2018).

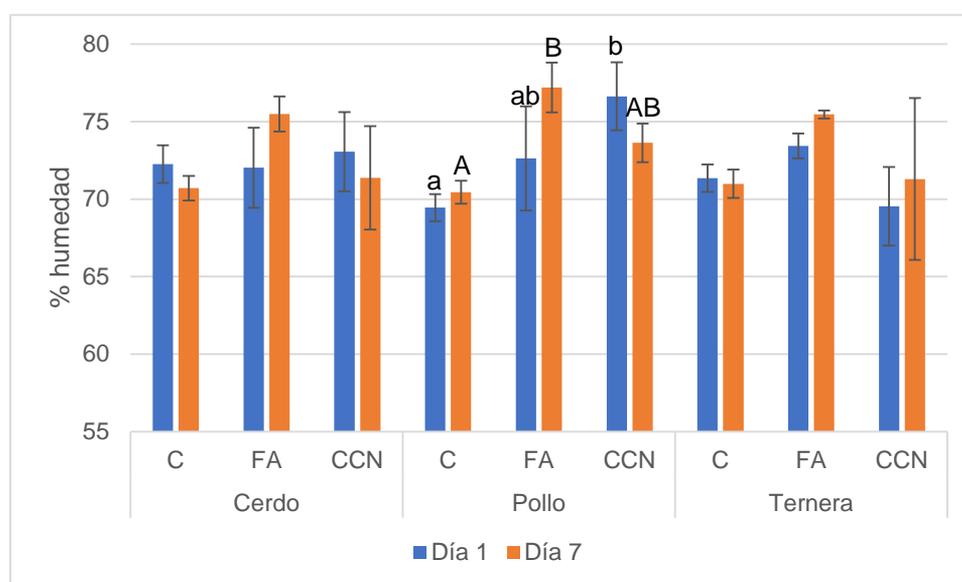


**Figura V.42.** Porcentaje de acidez de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Los análisis globales mostraron que la humedad se vio significativamente influenciada por los tres factores estudiados como se muestra en la tabla V.10. La carne de cerdo presentó la menor humedad ( $71,48 \pm 3,47$  %), mientras que la de pollo fue la que más humedad presentó ( $73,33 \pm 3,37$  %). La aplicación de cualquiera de las variedades de mucílago aumentó la humedad de las carnes ( $p = 0,005$ ), mientras que se observó una ganancia de humedad media entre los días

de muestreo ( $p=0,028$ ). El mantenimiento de la humedad es un factor muy importante para la conservación de la carne ya que influye en otros parámetros como color, aroma y textura (Ahmad et al., 2015). La aplicación de mucilago de cacao consiguió mantener la humedad y aumentar la CRA de las carnes y con ello retrasar las pérdidas de humedad que no evitan otros métodos de bioconservación (Behbahani et al., 2021; Noshad et al., 2021).

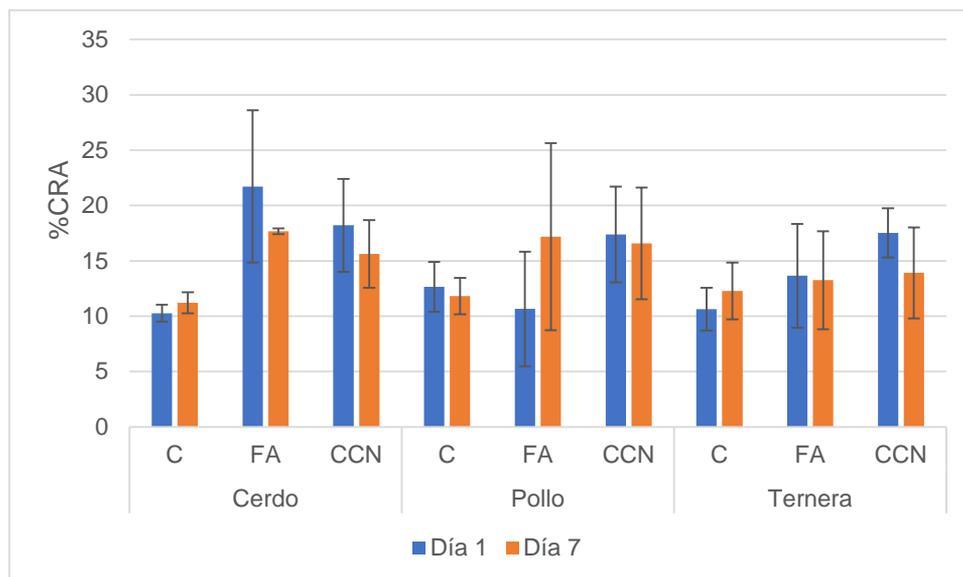
El porcentaje de humedad de los diferentes lotes de carnes se muestran en la figura V.43. El porcentaje de humedad de la carne de cerdo tras 1 día de almacenamiento fue de 72,3% y se mantuvo tras 7 días de almacenamiento. Estos valores son similares a los encontrados por Gou et al. (2003) en carne procedente de jamones de cerdo. Los tratamientos con mucilago de cacao no modificaron significativamente este parámetro. En cuanto a la carne de pollo, la humedad fue de 69,5% tras un día de almacenamiento y se mantuvo tras 7 días de almacenamiento. La aplicación de mucilago CCN-51 aumentó la humedad tras un día de almacenamiento hasta 76,3% ( $p<0,050$ ), mientras que la aplicación de mucilago Fino de Aroma provocó humedades significativamente superiores al control a los 7 días de almacenamiento con valores medios de 77,2% ( $p<0,050$ ). Estos valores están dentro del rango observado por Velasco et al. (2017). Finalmente, no se observaron diferencias en la humedad en la carne de ternera, que presentó valores de 71,3% en las carnes control. Los valores de humedad se encuentran cercanos a los observados por Behbahani et al. (2021) para ternera.



**Figura V.43.** Porcentaje de humedad de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

La CRA es una de los parámetros más importantes en la calidad de la carne, ya que define la capacidad de mantener toda o parte de su agua. En general, se define que las pérdidas de agua por purga o goteo tras el fileteado de la carne se sitúan entre el 2 y el 10% (Offer, 1988). En este sentido, el análisis global de los resultados mostró que el factor variedad de mucilago fue el único que influyó significativamente (Tabla V.10), de tal manera que el valor medio de CRA de las carnes control fue de  $11,47 \pm 1,75$  y las CRA de las carnes con mucilago estuvieron por encima de 15,5% ( $p= 0,001$ ). Respecto al análisis individual de los lotes de

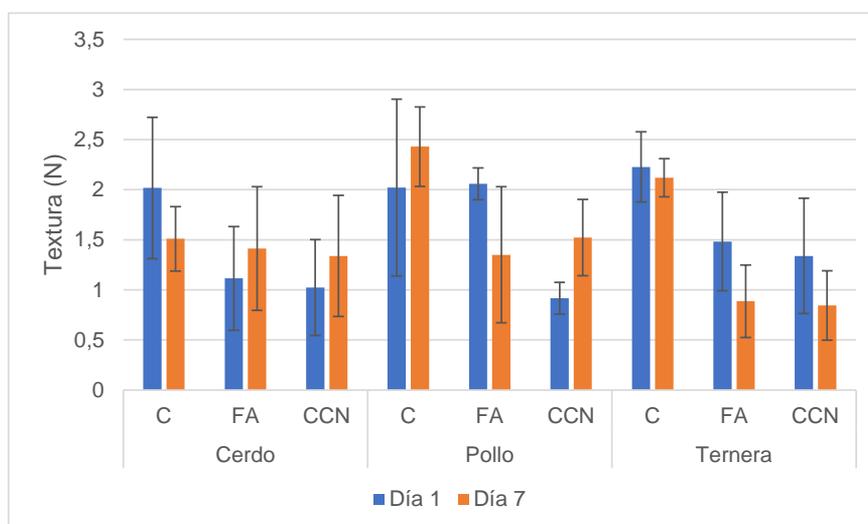
carnes, no se observaron diferencias en los tratamientos ni en los días de almacenamiento en las diferentes carnes. Los valores obtenidos se encuentran en el rango de 12 y 23% indicado por León et al. (2018), pero son inferiores a los indicados por Rengifo y Ordoñez (2010) que se sitúan para la carne de cerdo, pollo y ternera por encima del 20%. En el caso del cerdo, la CRA de los tratamientos control se situaron en 10,3% tras un día de almacenamiento, que se mantuvo a los 7 días. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas, la aplicación de los mucílagos aumentó la CRA a valores superiores al 15% tal y como se muestra en la figura V.44. Resultados similares se observaron para la carne de pollo y ternera, en las que la aplicación de los mucílagos incrementó los valores medios de CRA sin diferencias significativas ( $p>0,050$ ).



**Figura V.44.** Porcentaje de Capacidad de retención de agua (B) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Como se observa en la tabla V.10, en cualquiera de las aplicaciones de mucílagos se mejoró la humedad de las carnes, la CRA y disminuyó la dureza media de las carnes. Este último aspecto es interesante ya que las carnes con bajo pH suelen presentar una mayor dureza debido a la inhibición de las enzimas asociadas al ablandamiento de las carnes (Maltin et al., 2003). Sin embargo, los resultados mostraron una baja textura de las carnes. La aplicación de mucilago de cacao en las diferentes carnes provocó un descenso de los valores medios de la textura (Figura V.45), aunque sin diferencias significativas ( $p>0,050$ ). La carne de cerdo presentó una textura de 2,02 N tras un día de almacenamiento que descendió a 1,51 N tras 7 días a 4°C. Los valores de textura tras la aplicación de los mucílagos se situaron en torno a 1,1 N tras un día de almacenamiento, y aumentaron ligeramente hasta aproximadamente 1,4 N a los 7 días. Respecto al pollo, la textura fue de 2,01 N en el primer muestreo y aumentaron los valores medios hasta 2,43 N. La aplicación de mucilago Fino de Aroma presentó valores similares al control, mientras que CCN-51 provocó descensos de textura hasta valores medios inferiores a 1 N, aumentando hasta 1,5 N a los 7 días. Respecto a la ternera, los controles presentaron valores superiores a 2 N, mientras que los tratamientos con mucilago presentaron

valores cercanos a 1,5 N tras un día de almacenamiento que descendieron a valores inferiores a 1 N a los 7 días.

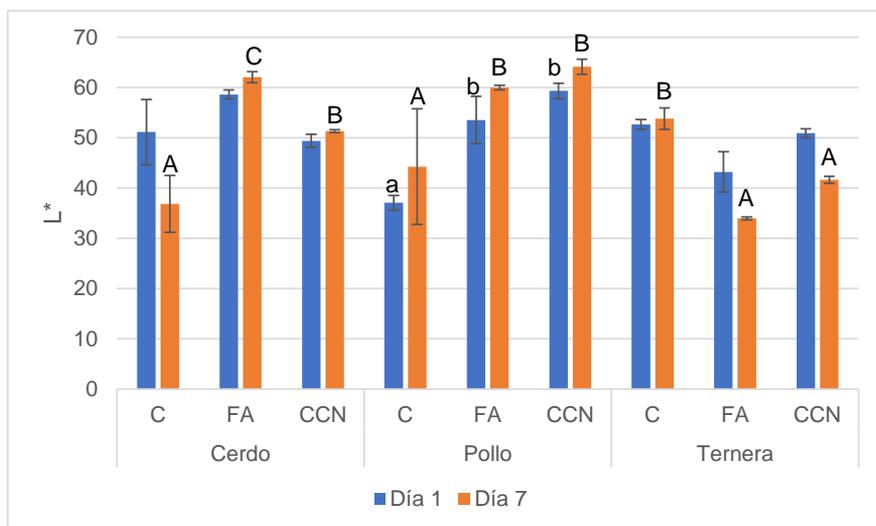


**Figura V.45.** Dureza expresada en newtons (N) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Respecto a los parámetros ópticos, se puede observar en la tabla V.10 que presentaron diferencias a nivel de los tres factores evaluados, además de presentar interacciones muy significativas entre los factores tanto para la luminosidad, color rojo, como color amarillo. La carne de ternera presentó los menores valores medios de luminosidad y los mayores de color rojo, mientras que la carne de pollo presentó las mayores intensidades de color amarillo ( $p < 0,001$ ). La aplicación de los mucílagos de cacao sobre las carnes provocó un aumento de la  $L^*$  de la carne del orden de 6 unidades, y la coordenada  $b^*$  del orden de dos unidades, mientras que disminuyó el color rojo alrededor de dos unidades en el caso del mucílago CCN-51 ( $p < 0,001$ ). Aunque se han observado diferencias significativas en la coloración instrumental de las carnes dependientes del tratamiento, hay que señalar que en general estos cambios serían difícilmente apreciables por el consumidor, ya que sólo un catador entrenado es capaz de diferenciar 3-4 unidades de variación del color (LaCie, 2006). Los principales factores que afectan al color de la carne son la temperatura implicada en la estabilidad de la mioglobina, la composición de gases durante el almacenamiento que generan los cambios de oxirreducción de la mioglobina y la oxidación lipídica (Tomasevic et al., 2021). La aplicación de recubrimientos en la carne tiene un efecto preservador del color asociado al mantenimiento de la humedad y a la permeabilidad de los gases (Cardoso et al., 2016). En este sentido, la aplicación de mucílago de cacao tiene un efecto de mantenimiento de la humedad además de una riqueza en compuestos antioxidantes (Silva et al., 2014) que pueden favorecer el mantenimiento del color.

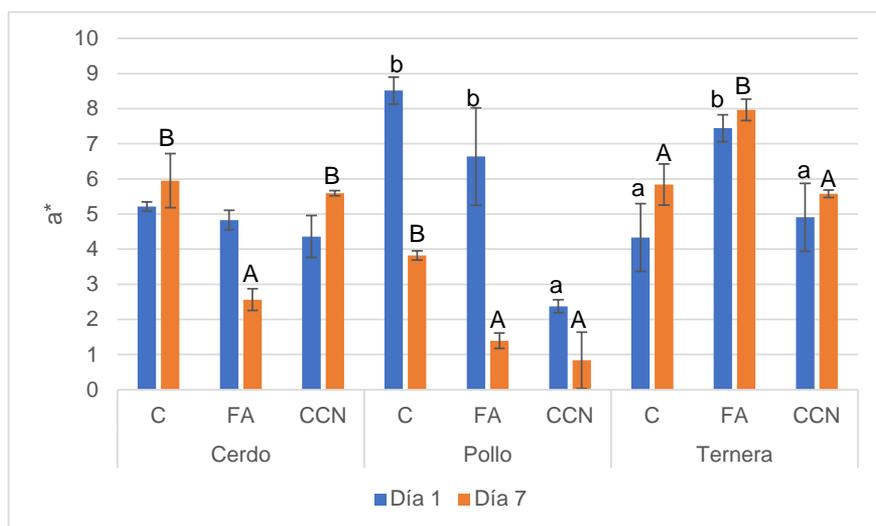
En la Figura V.46 se puede observar como la luminosidad de la carne de cerdo y pollo se vio favorecida por la aplicación de los mucílagos de cacao, especialmente tras 7 días de almacenamiento ( $p < 0,050$ ). Sin embargo, la aplicación de los mucílagos restó luminosidad a las carnes de ternera, presentando valores inferiores a los 7 días respecto al control ( $p < 0,050$ ). Según Alberti et al. (2016), en el caso de la carne de vacuno, altas luminosidades se relacionan

con bajo contenido de mioglobina y mayor cantidad de agua. Además, estos resultados son coincidentes con las observaciones en aplicaciones de recubrimientos comestibles en carne de ternera, donde los recubrimientos redujeron la luminosidad de las carnes (Cardoso et al., 2016).



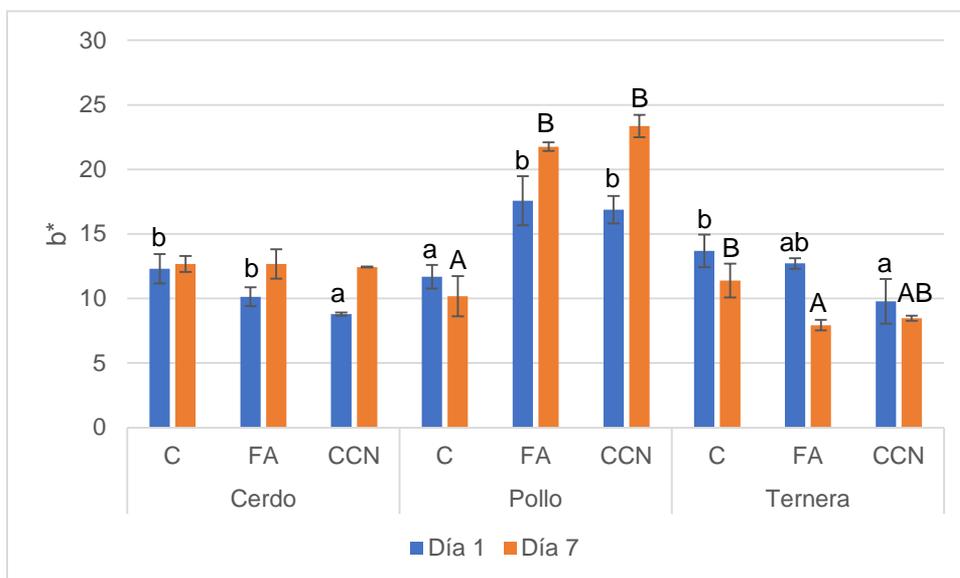
**Figura V.46.** Luminosidad ( $L^*$ ) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Respecto al espectro de color rojo, se puede observar como todas las carnes se situaron entre 2 y 9 unidades (Figura V.47). En las aplicaciones de mucílago sobre las carnes de cerdo y pollo se observó un descenso del color rojo tras 7 días de almacenamiento, mientras que en la ternera se observó un mantenimiento de este parámetro.



**Figura V.46.** Valores eje rojo-verde ( $a^*$ ) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Finalmente, con respecto a la coloración amarilla, se puede observar como la carne de pollo presentó valores superiores a las otras dos carnes (Figura V.47). Además, se puede observar como la aplicación de los mucílagos aumentó este parámetro en los dos días de muestreo evaluados ( $p < 0,050$ ). Los resultados de color de la carne de pollo son similares a los obtenidos por Velasco et al. (2017) en el que encontraron valores para  $a^*$  entre 4,6 y 9,1 y para el parámetro  $b^*$  entre 8,5 y 12,5.



**Figura V.47.** Valores del eje amarillo-azul ( $b^*$ ) (C) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

## V.6.2. Análisis microbiológico

La composición de la población microbiana durante la fermentación del cacao ha sido caracterizada por técnicas dependientes e independientes de cultivo en los trabajos de Figueroa-Hernández et al. (2019), Morante-Cariel et al. (2023), Pacheco-Montealegre et al. (2020), Papalexandratou et al. (2011), Taylor et al. (2022), y Viesser et al. (2021). La fermentación del cacao está dominada por levaduras productoras de etanol como *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*, *S. cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae*. Entre las BAL se han descrito *Leuconostoc pseudomesenteroides* (fermentadoras de glucosa y fructosa), *Fructobacillus tropaeoli* (fementadora de fructosa), *Lactiplantibacillus plantarum* (fermentadora de fructosa y glucosa) *Lactococcus* spp. y *Limosilactobacillus fermentum* (productoral de manitol) entre otras. Entre las enterobacterias se han encontrado *Tatumella saanichensis* y *Tatumella punctata* presents en la fase inicial de la fermentación. Otro grupo dominante son las bacterias acéticas destacando las especies *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter ghanensis/syzygii*, que aparecen en las etapas finales de la fermentación y transforman el etanol en ácido acético.

La población de BAL descrita en fermentación del cacao han sido ampliamente caracterizadas respecto a su actividad antimicrobiana asociada al metabolismo de los azúcares y la producción de bacteriocinas y otras sustancias activas. Así, Roccheti et al. (2021) han

revisado los mecanismos antimicrobianos de *Lactiplantibacillus plantarum*; Pakroo et al. (2022) y Enan et al. (2013) han caracterizado la actividad de *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactococcus* sp. respectivamente, frente a bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Por lo tanto, el mucílago de cacao es una fuente de diversas cepas antimicrobianas que pueden ser aplicadas en la bioconservación de carnes tal y como han demostrado Morante-Carriel et al., (2023).

En la tabla V.11 se muestra el efecto de los factores tipo de carne, variedad de mucílago y tiempo de conservación sobre los recuentos de levaduras, *E. coli* y BAL.

**Tabla V.11.** Recuentos globales expresados de levaduras, *Escherichia coli* y bacterias ácido lácticas en función de los factores tipo de carne, variedad de mucílago y tiempo de refrigeración a 4°C.

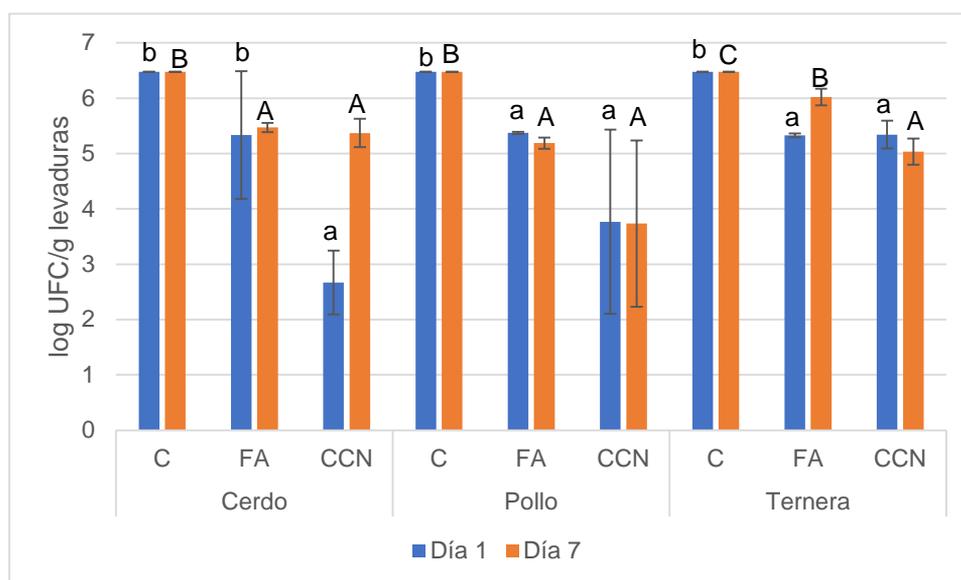
Factores	Levaduras (Log UFC/g)		<i>E. coli</i> (Log UFC/g)		BAL (Log UFC/g)	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
niveles						
<i>Carne (C)</i>						
Cerdo	5,29* ± 1,39		5,35 <sup>b</sup> ± 0,91		5,68 <sup>b</sup> ± 0,26	
Pollo	5,16 ± 1,38		5,24 <sup>b</sup> ± 1,07		5,39 <sup>a</sup> ± 0,27	
Ternera	5,38 ± 1,23		4,88 <sup>a</sup> ± 1,26		5,78 <sup>c</sup> ± 0,34	
<i>Variedad mucílago (V)</i>						
Control	>6,47 <sup>c</sup> ± 0,00		>6,47 <sup>b</sup> ± 0,00		5,51 <sup>a</sup> ± 0,26	
CCN51	4,32 <sup>a</sup> ± 1,31		4,51 <sup>a</sup> ± 0,89		5,68 <sup>b</sup> ± 0,39	
Fino de Aroma	5,06 <sup>b</sup> ± 1,06		4,48 <sup>a</sup> ± 0,39		5,66 <sup>b</sup> ± 0,32	
<i>Tiempo de almacenamiento (T)</i>						
1 día	4,99 <sup>a</sup> ± 1,55		5,02 <sup>a</sup> ± 1,11		5,53 <sup>a</sup> ± 0,37	
7 días	5,58 <sup>b</sup> ± 0,96		5,29 <sup>b</sup> ± 1,07		5,72 <sup>b</sup> ± 0,27	
P-valores						
Pruebas de efectos						
C	0,546		<0,001		<0,001	
V	<0,001		<0,001		<0,001	
T	0,001		0,002		<0,001	
C*V	0,001		0,001		<0,001	
C*T	0,053		0,003		0,457	
V*T	<0,001		0,040		<0,001	
C*V*T	<0,001		<0,001		<0,001	

\*Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

En general los recuentos microbiológicos observados en los tres tipos de carnes fueron elevados probablemente asociados a un mal faenado de la carne o a un periodo prolongado de conservación previo a la adquisición (Signorini et al., 2017). Los valores medios globales de recuentos de levaduras, *E. coli* y BAL se situaron en todas las carnes cercanos o superiores a 5 log UFC/g. El efecto de la aplicación de los mucílagos pudo observarse tanto en los recuentos de levaduras como *E. coli*, mientras que en las BAL los recuentos fueron significativamente superiores en las aplicaciones de mucílago ( $p < 0,050$ ). En el caso de las levaduras, los controles

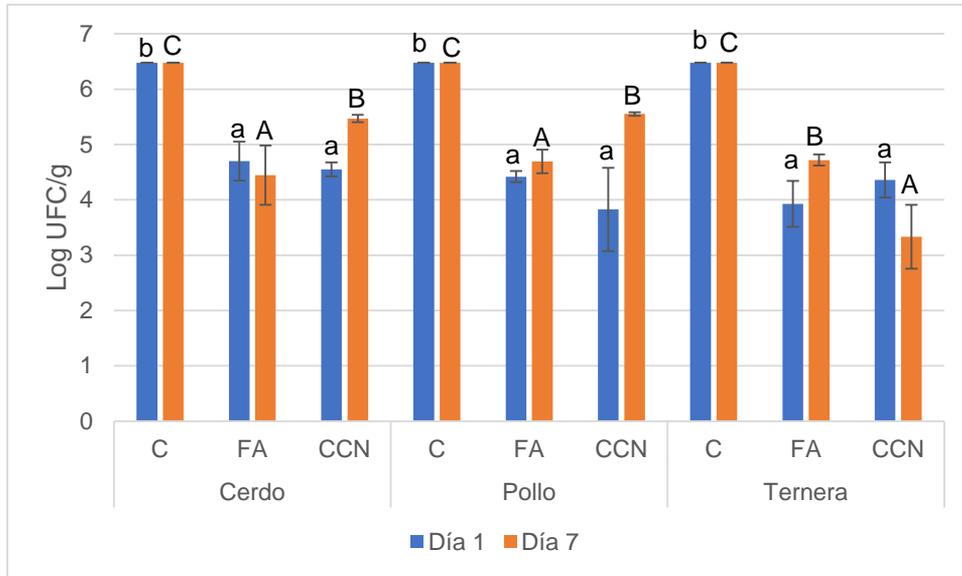
presentaron valores medios globales superiores a 6 log UFC/g, mientras que los valores obtenidos con los mucílago se sitúan en reducciones medias de 1,5 log UFC/g ( $p < 0,050$ ). Por su parte, los recuentos de *E. coli* de los controles fueron reducidos en más de 2 log UFC/g tras la aplicación de los mucílago ( $p < 0,050$ ).

Se puede observar como los recuentos de levaduras en las carnes control se situaron por encima de los 6 log UFC/g (Figura V.48). La aplicación de los mucílago de cacao redujo los recuentos de levaduras en todas las carnes, con niveles de reducción comprendidos entre aproximadamente 0,5 log UFC/g en la carne de ternera tras 7 días de almacenamiento con el mucílago Fino de Aroma y 4 log ufc/g para la carne de cerdo tras 1 día de almacenamiento con el mucílago CCN-51.



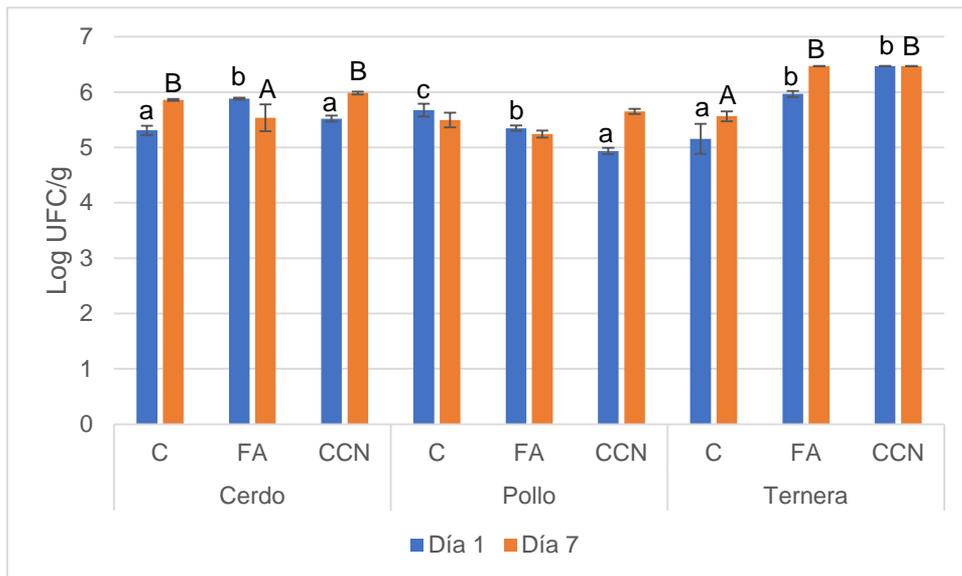
**Figura V.48.** Recuentos de levaduras expresadas en log UFC/g de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

En el caso de las bacterias coliformes, que en las carnes control se situaron por encima de los 6 log UFC/g, presentaron reducciones tras la aplicación de mucílago de cacao entre aproximadamente 1 log UFC/g de la carne de pollo tras 7 días de refrigeración con el mucílago CCN-51 alrededor de 3 log UFC/g de los tratamientos con mucílago CCN-51 en carne de ternera tras 7 días de almacenamiento (Figura V.49). Estos niveles de reducción son similares a los obtenidos con recubrimientos comestibles con mucílago de semillas de *Malva silvestris* que contenía 2% de aceite esencial de cinamomo, con contrastadas propiedades antimicrobianas (Sabahi et al., 2022). Otros recubrimientos antimicrobianos han producido niveles inferiores de inhibición de *E. coli* a los observados en el presente trabajo. Por ejemplo, el recubrimiento de mucílago de semilla de *Plantago major* enriquecido con 2% de aceite esencial de limón alcanzó reducciones en torno a 0,5 log UFC/g (Noshad et al., 2021).



**Figura V.49.** Recuentos de coliformes expresadas en log UFC/g de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Finalmente, en cuanto a los resultados de los recuentos de BAL, se puede observar como en todos los tratamientos se situaron por encima de los 5 log UFC/g, encontrando que tras la aplicación de los mucílagos los niveles de BAL se incrementaron en las carnes de ternera (Figura V.50).



**Figura V.50.** Recuentos de bacterias ácido lácticas expresadas en log UFC/g de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4°C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Este trabajo pone de manifiesto la adecuación de la aplicación de mucílago de cacao para la bioconservación de diferentes tipos de carnes. En concreto se puede destacar el elevado nivel de reducción encontrado frente a bacterias patógenas como *E. coli*.

## **VI. Conclusiones**

## VI. Conclusiones

**PRIMERA:** El mucílago del cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 representa un subproducto con interesantes propiedades nutricionales y funcionales, caracterizado por su elevado contenido en carbohidratos, fibra, proteínas y polifenoles. Además, tras el proceso de fermentación espontánea del mucílago del cacao los microorganismos que dominan son bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas y levaduras que pueden ser utilizadas por sus propiedades tecnológicas y funcionales.

**SEGUNDA:** La generación de bioetanol a partir de mucílago de cacao tras su fermentación por *Saccharomyces cerevisiae* generó una interesante producción con contenidos superiores a 50 ° de alcohol (% v/v) y rendimientos superiores a 400 mL.

**TERCERA:** La inclusión de mucílago de cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 en proporciones del 10 y 15% puede ser considerado un interesante ingrediente para la elaboración de bebidas fermentadas de frutas como la naranja y carambola, encontrando las principales diferencias asociadas al tipo de fruta, mientras que el incremento del % de mucílago supuso un incremento en el contenido de alcohol. Estas bebidas independientemente de la fruta base o de la variedad y concentración de mucílago añadida fueron positivamente valoradas por el panel de catadores no entrenados en todos los atributos evaluados.

**CUARTA:** Los parámetros fisicoquímicos y composicionales del té de kombucha utilizando el mucílago de cacao como fuente de azúcar para el SCOBY se ven muy influenciados por el tipo de té base y la concentración de mucílago añadida. El incremento del contenido de mucílago de cacao mejoró significativamente el aroma y sabor del té; sin embargo, incrementó el contenido en alcohol, superándose el límite máximo para este parámetro en normativas internacionales, sólo cumpliéndose cuando se adicionó un 15% de mucílago.

**QUINTA:** Los parámetros físicoquímicos de las cervezas artesanales tipo Ale con las variedades de lúpulo Cascade y Northern Brewer se vieron afectadas por la variedad de mucílago utilizada; siendo sólo dos los influidos por la concentración de mucílago añadida, espuma y grado alcohólico, éste último duplicándose por la presencia de 20-30% de mucílago de cacao. Asimismo, se incrementó el amargor de la cerveza con la inclusión de mucílago, así como los parámetros colorimétricos del espacio CIELab. Las cervezas elaboradas con mucílago de cacao fueron altamente valoradas por el panel de catadores, resaltando la mejora en la apariencia cuando se utilizó la variedad del mucílago Fino de Aroma.

**SEXTA:** Los mucílagos de cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 permiten una mejor conservación de carnes frescas de cerdo, pollo y ternera mediante la reducción en 2 unidades logarítmicas del contenido en *Escherichia coli* y levaduras asociada a las bacterias ácido-lácticas naturalmente presentes en el mucílago de cacao. La aplicación de mucílago de cacao afecto a los parámetros acidez, humedad, capacidad de retención de agua, dureza y color relacionados con la calidad de las carnes.

**SÉPTIMA:** La revalorización del mucílago del cacao de las variedades Fino de Aroma y CCN-51 mediante las aplicaciones desarrolladas en esta Tesis Doctoral pueden contribuir a una gestión más sostenible de los residuos y subproductos asociados a la producción de Cacao en Ecuador, además de generar valor añadido a este sector esencial para el desarrollo de las comunidades agrícolas de este país.

## **VII. Bibliografía**

## VII. Bibliografía

- Aaslyng, M. D., Oksama, M., Olsen, E. V., Bejerholm, C., Baltzer, M., Andersen, G., ... & Gabrielsen, G. (2007). The impact of sensory quality of pork on consumer preference. *Meat Science*, 76(1), 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.014>
- Abballe, C., Gomes, F. M. L., Lopes, B. D., de Oliveira, A. P. F., Berto, M. I., Efraim, P., & Tfouni, S. A. V. (2021). Cocoa beans and derived products: Effect of processing on polycyclic aromatic hydrocarbons levels. *Lwt*, 135, 110019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110019>
- Aboyeji, C. M., Olofintoye, T. A. J., Olaleye, O., Olugbemi, O., & Adetula, O. A. (2016). Influence of cocoa pod husk powder on the performance of black benniseed under basal application phosphorus fertilizer in the Southern Guinea Savannah of Nigeria. *Advances in Environmental Biology*, 10(7), 78-83.
- Abuduaibifu, A., & Tamer, C. E. (2019). Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9), e14077. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14077>
- Adamski, M., Kuzniacka, J., & Milczewska, N. (2017). Preferences of consumers for choosing poultry meat. *Polish Journal of Natural Sciences*, 32(2), 261-271.
- Adi-Dako, O., Ofori-Kwakye, K., Manso, S. F., Boakye-Gyasi, M. E., Sasu, C., & Pobee, M. (2016). Physicochemical and antimicrobial properties of cocoa pod husk pectin intended as a versatile pharmaceutical excipient and nutraceutical. *Journal of Pharmaceutics*, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7608693>
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011). Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cacao (*Theobroma cacao*) beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 755-764. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224>
- Afolabi, M. O., Ibitoye, W. O., & Agbaje, A. F. (2015). Evaluation of nutritional and sensory properties of cocoa pulp beverage supplemented with pineapple juice. *Journal of Food Research*, 4(6), 58. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n6p58>
- Agudelo, M. (2014). El bioetanol como alternativa energética. *Hechos Microbiológicos*, 5 (2), 2-2. <http://www.udea.edu.co/hm>
- Aguilera, C., Barberá, J., Díaz, E., Duarte, A., Gálvez, J., Gil, A., ... & Zarzuelo, A. (2007). Alimentos funcionales: Aproximación a una nueva alimentación. Coordinadores: Barberá JM, Marcos A. Ed: Dirección General de Salud Pública y Alimentación.
- Ahmad, S. R., Gokulakrishnan, P., Giriprasad, R., & Yattoo, M. A. (2015). Fruit-based natural antioxidants in meat and meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1503-1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.701674>
- Akinwale TO (2000) Extraction of Pulp from Fresh Cocoa Beans for Wine Production. *Annual Report of Cocoa Research Institute of Nigeria (CRIN)*, 75.
- Akpo, A.S.M., Alain, Y. A., Théodore, D. N. dede, Gabaze, G. A. A., Julien, C. K., Robert, G. J., Bernard, Y. O., & Rajeshwar, T. D. (2020). Valorization of the Mucilage Juice of Cocoa Beans for the Production of a Biopesticide based on *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

HD-1. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(11), 3600–3610. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.431>

- Alberti, P., Ripoll, G., & Panea, B. (2016). Clasificación objetiva del color de la carne de denominaciones de venta de vacuno. *Eurocarne*, 244, 131–142.
- Almeida, O. G. G. D., Pinto, U. M., Matos, C. B., Frazilio, D. A., Braga, V. F., von Zeska-Kress, M. R., & De Martinis, E. C. P. (2020). Does quorum sensing play a role in microbial shifts along spontaneous fermentation of cocoa beans? An in silico perspective. *Food Research International*, 131, 109034. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109034>
- Alonso. (2018). Materias Primas Usadas Para La Producción De Etanol De Cuatro Generaciones: Agrocienca, 52, 967–990. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952018000700967&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000700967&nrm=iso)
- Álvarez, T., Bravo, E., & Armendaris, E. (2012). Soberanía alimentaria y acceso a semillas hortícolas en el Ecuador. *La Granja*, 16(2), 23–47.
- Amarasinghe, H., Weerakkody, N. S., & Waisundara, V. Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. *Food Science & Nutrition*, 6(3), 659–665. <https://doi.org/10.1002/fsn3.605>
- Amaya, N. A., & Diaz, L. M. (2019). Evaluación de perfiles fermentativos para la elaboración de cerveza artesanal por levaduras nativas (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).
- Amazará. (2022). Recuento De Los Microorganismos Aerobios Mesofilos. *Universidad Francisco de Paila Santander, June*, 1–6.
- Amir, I. Z., Hanida, H. S., & Syafiq, A. (2013). Development and physical analysis of high fiber bread incorporated with cocoa (*Theobroma cacao* sp.) pod husk powder. *International Food Research Journal*, 20(3), 1301.
- Amorim, G. M., dos Santos, T. C., Pacheco, C. S. V., Barreto, I. M. A., Freire, D. M. G., & Franco, M. (2012). Fermentation of cocoa meal by *Aspergillus niger* to obtain lipase. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 8(1), 24. <https://doi.org/10.4013/ete.2012.81.04>
- Anderson, H. E., Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2019). A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*, 1085, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>
- Andrade. (2021). Application of Cocoa Mucilage (*Theobroma Cacao*) In the Treatment of Wastewater from the Production of Cassava Starch (*Manihot Esculenta*). *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(7), 1220–1235. <https://annalsofscb.ro/index.php/journal/article/view/10376>
- Aparco, R. H., Tadeo, F. T., Gabriela, F., Paz, C., Del, M., Delgado, C., César, J., & Mamani, M. (2023). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en una bebida funcional. *Revista de Investigación En Ciencias Agronómicas y Veterinarias*, 7(19), 218–231.
- Astiasarán, I. (2000). Alimentos: composición y propiedades (No. 664.02 A854a). McGraw-Hill.

- Anvoh, K. Y. B., Bi, A. Z., & Gnakri, D. (2009). Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(2), 129-133.
- AOAC Official Method 947.05 Acidity of Milk. (2000). *Public Health*, 428(43), 7782–7782.
- Aranaz, P., Romo-Hualde, A., Navarro-Herrera, D., Zabala, M., López-Yoldi, M., González-Ferrero, C., ... & González-Navarro, C. J. (2019). Low doses of cocoa extract supplementation ameliorate diet-induced obesity and insulin resistance in rats. *Food & Function*, 10(8), 4811-4822. <https://doi.org/10.1039/C9FO00918C>
- Arciniega-Alvarado, G. A., & Espinoza-León, R. A. (2020). Optimización de una bebida a base del Mucílago del Cacao (*Theobroma cacao*), como aprovechamiento de uno de sus subproductos. *Dominio de las Ciencias*, 6(3), 310-326. <http://dx.doi.org/10.23857/dc.v6i3.1286>
- Aregheore, E. Chemical Evaluation and Digestibility of Cocoa (*Theobroma cacao*) Byproducts Fed to Goats. (2002). *Tropical Animal Health and Production*, 34, 339–348. <https://doi.org/10.1023/A:1015638903740>
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Restani, P., & Martelli, A. (2001). Characterization of pectins and some secondary compounds from *Theobroma cacao* hulls. *Journal of Food Science*, 66(5), 653-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04616.x>
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Research International*, 38(8-9), 1009-1014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.012>
- Armijos. (2021). Análisis de la concentración del mercado del sector agrícola en el Ecuador. Período 2015 –2019. *Revista Cumbres*, 7(1), 55–66.
- Arteaga. (2013). Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón Naranjal (Provincia del Guayas). *ECA Sinergia*, 4(1), 49–59.
- Aung, T., & Eun, J. B. (2021). Production and characterization of a novel beverage from laver (*Porphyra dentata*) through fermentation with kombucha consortium. *Food Chemistry*, 350, 129274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129274>
- Awang, A., Karim, R., & Mitsui, T. (2010). Proteomic analysis of *Theobroma cacao* pod husk. *Journal of Applied Glycoscience*, 57, 245-264. <https://doi.org/10.5458/jag.57.245>
- Awolu, O., & Oyeyemi, S. O. (2015). Optimization of bioethanol production from cocoa (*Theobroma cacao*) bean shell. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 4(4), 506-514.
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., ... & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*, 1(3), 202-232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>
- Ayeni, L. S., Adetunji, M. T., Ojeniyi, S. O., Ewulo, B. S., & Adeyemo, A. J. (2008). Comparative and cumulative effect of cocoa pod husk ash and poultry manure on soil and maize nutrient contents and yield. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2(1), 92-97.
- Azmin, S. N. H. M., & Nor, M. S. M. (2020). Development and characterization of food packaging bioplastic film from cocoa pod husk cellulose incorporated with sugarcane

- bagasse fibre. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 5(4), 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.10.003>
- Baggott, M. J., Childs, E., Hart, A. B., de Bruin, E., Palmer, A. A., Wilkinson, J. E., & de Wit, H. (2013). Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 228, 109-118. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3021-0>
- Baiano, A. (2021). Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1829-1856. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>
- Baiano, A., Fiore, A., la Gatta, B., Tufariello, M., Gerardi, C., Savino, M., & Grieco, F. (2023). Single and interactive effects of unmalted cereals, hops, and yeasts on quality of white-inspired craft beers. *Beverages*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.3390/beverages9010009>
- Barbosa-Pereira, L., Guglielmetti, A., & Zeppa, G. (2018). Pulsed electric field assisted extraction of bioactive compounds from cocoa bean shell and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 818-835. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2045-6>
- Barcenilla, C., Ducic, M., López, M., Prieto, M., & Álvarez-Ordóñez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*, 183, 108661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108661>
- Bartolo, L., Cabellos, J., Gavidia, A., & Hoyos, C. (2013). Efecto del vacío en la absorbancia y el grado alcohólico en dos tipos de “Chicha de Jora”. *Agroindustrial Science*, 3(2), 117-124. <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2013.02.05>
- Bedoya, D., Gomez, E., Luján, D., & Salcedo, J. (2005). Producción de vino de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck) por fermentación inducida comparando dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Temas Agrarios*, 10(2), 26-34. <https://doi.org/10.21897/rt.v10i2.632>
- Behbahani, B.A., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2458-2467. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2186>
- Berenguer, M.; Vegara, S.; Barrajon, E.; Saura, D.; Valero, M.; Marti N. (2016). Physicochemical characterization of pomegranate wines fermented with three different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Food Chemistry*, 190 (2016) 848–855. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.027>
- Bhat, R., Ameran, S. B., Voon, H. C., Karim, A. A., & Tze, L. M. (2011). Quality attributes of starfruit (*Averrhoa carambola* L.) juice treated with ultraviolet radiation. *Food Chemistry*, 127(2), 641-644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.042>
- Bhattacharya, D., Nanda, P. K., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Dhar, P., & Das, A. K. (2022). Lactic acid bacteria and bacteriocins: novel biotechnological approach for biopreservation of meat and meat products. *Microorganisms*, 10(10), 2058. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102058>
- Bibek, R. (2018). Biopreservatives and Biopreservation. In R. Bibek & M. Daeschel (Eds.), *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRS Press.

- Boletín Técnico “Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2020,” *Boletín Técnico* 1 (2021).
- Bonvehí, J. S., & Coll, F. V. (1999). Protein quality assessment in cocoa husk. *Food Research International*, 32(3), 201-208. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00088-5)
- Borşa, A., Muntean, M. V., Salanţă, L. C., Tofană, M., Socaci, S. A., Mudura, E., ... & Pop, C. R. (2022). Effects of Botanical Ingredients Addition on the Bioactive Compounds and Quality of Non-Alcoholic and Craft Beer. *Plants*, 11(15), 1958. <https://doi.org/10.3390/plants11151958>
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127(4), 1821-1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.071>
- Burgos. (2021). Agricultura campesina de la Costa ecuatoriana: realidades y perspectivas. *Ecuador Debate*, 1–229.
- Burini. (2017). Parámetros de calidad del lúpulo. [https://ipatec.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/72/2017/12/IPATEC-Calidad-de-LúpuloIPATEC\\_v19\\_12\\_17.pdf](https://ipatec.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/72/2017/12/IPATEC-Calidad-de-LúpuloIPATEC_v19_12_17.pdf)
- Calado, L. S., Lacerda, A. L. F., Fiaux, S. B., Sphaier, L. A., Silva, V. N. H., & Peixoto, F. C. (2019). Low-cost fluorescence-based method for beer bitterness measurement. *Journal of Food Engineering*, 262, 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.015>
- Camargo, N., & Williams, D. (2012). Uso de residuos agrícolas para la producción de biocombustibles en el departamento del Meta. *Tecnura*, 16(34), 142-156.
- Campos, R., Galvan, D., Effting, L., Terhaag, M. M., Yamashita, F., de Toledo Benassi, M., & Spinosa, W. A. (2021). Effects of adding spices with antioxidants compounds in red ale style craft beer: A simplex-centroid mixture design approach. *Food Chemistry*, 365, 130478. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130478>
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172-184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Cardoso, G. P., Dutra, M. P., Fontes, P. R., Ramos, A. D. L. S., de Miranda Gomide, L. A., & Ramos, E. M. (2016). Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. *Meat Science*, 114, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>
- Cardoso, A., Pimentel, T. C., do Vale, R. B., Clementino, L. S., Ferreira, E. T. J., Magnani, M., & dos Santos Lima, M. (2021). American pale Ale craft beer: Influence of brewer's yeast strains on the chemical composition and antioxidant capacity. *LWT*, 152, 112317. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.11231>
- Carvajal. (2008). Assessing Texture To Five Beef Meat Cuts Preserved By Sterilization in Tinplate Packaging. *Vitae*, 15(43), 232–243. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-40042008000200005&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042008000200005&lng=en&tlng=es).
- Carvajal, C. A. ., Tafur-Escanta, P. M. ., & Villavicencio-Poveda, A. . (2018). Characterization of the Calorific Power of the Residual Biomass of Cacao CCN51 through Anaerobic and Thermochemical Gasification Processes. *Científica*, 1(1), 12. <https://www.redalyc.org/journal/614/61458109004/>
- Castano, H., Cardona Betancur, M., Mejia Gomez, C., & Acosta Cardenas, A. (2011). Ethanol

- production from cassava flour in simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation system. *Dyna*, 78(169), 158-166.
- Castañeda, R., José, A. C. M., Yolanda, A., & Gabriela, V. M. (2018). Efecto de la adición de quinua (*Chenopodium quinoa* wild) malteada y sin maltear en la elaboración de cerveza tipo Ale a base de cebada (*Hordeum vulgare*) malteada. *Enfoque UTE*, 9(2), 15-26.
- Castillo, A. (2010). Determinación de parámetros de co-cultivo de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol. In *Universidad Iberoamericana Estudios* (pp. 1–77). <http://www.bib.uia.mx/tesis/pdf/014520/014520.pdf>
- Castillo, A. (2012). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diesel mexicanos reformulados con Etanol. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XIII(número 3), 293–306. <http://www.scielo.org.mx/pdf/iit/v13n3/v13n3a4.pdf>
- Castillo, D., Quevedo, L., & Román, G. (2018). Aprovechamiento turístico de los recursos naturales. Estudio de caso: Hacienda La Primavera, Quinsaloma–Ecuador. 11. <http://hdl.handle.net/20.500.11763/turydes25quinsaloma>
- CEPAL, N. (2021). La Inversión Extranjera Directa en América Latina y el Caribe 2021. CEPAL.
- Chagas Junior, G. C. A., Ferreira, N. R., & Lopes, A. S. (2021). The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: An overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 544-552. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14740>
- Chan, S. Y., & Choo, W. S. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry*, 141(4), 3752-3758. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.097>
- Chang, J. F. V., Cortez, L. H. V., Alvarado, K. E., Vásquez, E. C. C. L., Barcia, C. S. R., Flor, F. G. I., ... & Orejuela, F. P. (2023). Caracterización de la miel obtenida del mucílago de tres grupos genéticos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Bases de la Ciencia*. 8(2), 17-30. <https://doi.org/10.33936/revbasdelaciencia.v8i1.5728>
- Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 834-839. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
- Chung, B. Y., & Han, K. W. (2003). Compositional characterization of cacao (*Theobroma cacao* L.) hull. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 46(1), 12-16.
- CNF. Canadian Nutrient Files (Consultado en 2023). Food code: 4223, 2015. <https://food-nutrition.canada.ca/cnf-fce/?lang=eng>
- Collymore, A., Arencibia Jorge, R., Blanco García, A., & Araújo Ruiz, J. A. (2008). Producción científica mundial sobre biodiesel. *Acimed*, 18(5), 1–19.
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., ... & Settanni, L. (2016). Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 572-581. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.014>
- Corvalán, C., Garmendia, M. L., Jones-Smith, J., Lutter, C. K., Miranda, J. J., Pedraza, L. S., Popkin, B. M., Ramírez-Zea, M., Salvo, D., & Stein, A. D. (2017). Nutrition status of

- children in Latin America. *Obesity Reviews*, 18(July), 7–18. <https://doi.org/10.1111/obr.12571>
- Cury, Aguas M, Y., Martinez M, A., Olivero V, R., & Chams Ch, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 9(S1), 122–132. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.ns.2017.530>
- Dahunsi, S. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., & Izebere, J. O. (2019a). Cleaner energy through liquefaction of Cocoa (*Theobroma cacao*) pod husk: Pretreatment and process optimization. *Journal of Cleaner Production*, 226, 578-588. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.112>
- Dahunsi, S. O., Osueke, C. O., Olayanju, T. M. A., & Lawal, A. I. (2019b). Co-digestion of *Theobroma cacao* (Cocoa) pod husk and poultry manure for energy generation: Effects of pretreatment methods. *Bioresource Technology*, 283, 229-241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.093>
- Davison, G., Callister, R., Williamson, G., Cooper, K. A., & Gleeson, M. (2012). The effect of acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *European Journal of Nutrition*, 51, 69-79. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0193-4>
- de Andrade Almeida, A. C., de Moraes Pontes, J. G., Alvarenga, G. R., Finocchio, H., & Fill, T. P. (2021). The sustainable cycle of a new cacao-based bioplastic: from manufacturing to exploitable biodegradation products. *RSC Advances*, 11(48), 29976-29985. <https://doi.org/10.1039/D1RA04432J>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 432-453. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. In *Journal of Applied Microbiology*. 121 (1), 5–17). <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Delgado-Noboa, J. W., Soler, J., & Peña, J. Á. (2018). Optimización de la producción de bioetanol en procesos fermentativos del mucílago de Cacao CCN–51 en un biorreactor tipo batch. *Jornada de Jóvenes Investigadores e Investigadoras del I3A*, 6.
- Delgado-Noboa, J., Bernal, T., Soler, J., & Peña, J. Á. (2021). Kinetic modeling of batch bioethanol production from CCN-51 Cocoa Mucilage. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 128, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.08.040>
- Delgado-Ospina, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. Á., Martuscelli, M., & Chaves-López, C. (2021). Bioactive compounds and techno-functional properties of high-fiber co-products of the cacao agro-industrial chain. *Heliyon*, 7(4), e06799. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06799>
- de Souza Vandenberghe, L. P., Valladares-Diestra, K. K., Bittencourt, G. A., de Mello, A. F. M., Vásquez, Z. S., de Oliveira, P. Z., ... & Soccol, C. R. (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*, 344, 126252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>
- Desvita, H., & Faisal, M. (2022). Materials Today : Proceedings Antimicrobial potential of wood vinegar from cocoa pod shells (*Theobroma cacao* L.) against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. *Materials Today: Proceedings*, 63, S210–S213. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.02.410>

- Desvita, H., Faisal, M., & Mahidin, M. (2023). Natural antimicrobial properties of liquid smoke derived from cocoa pod shells in meatball preservation. *South African Journal of Chemical Engineering*, 46, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2023.08.003>
- Dias, D. R. (2014). Agro industrial uses of cocoa by-products. In: *Cocoa and Coffee Fermentation*. CRC Press, Boca Raton, FL. 309-341.
- Dias, D. R., Schwan, R. F., Freire, E. S., & Serôdio, R. D. S. (2007). Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(3), 319-329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01226.x>
- Díaz, M. (2016). La tecnología de elaboración de vino como factor determinante del diseño constructivo de las bodegas (Doctoral dissertation, Universidad de La Rioja).
- Díaz, & De Vuyst. (2022). Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 39–66. <https://doi.org/10.1111/jam.15312>
- Díaz-Muñoz, C., Van de Voorde, D., Comasio, A., Verce, M., Hernandez, C. E., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2021). Curing of cocoa beans: fine-scale monitoring of the starter cultures applied and metabolomics of the fermentation and drying steps. *Frontiers in Microbiology*, 11, 616875. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616875>
- Diniz, D. D. M., Druzian, J. I., & Audibert, S. (2012). Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite. *Polímeros*, 22, 278-281. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000032>
- Djordjević, S., Popović, D., Despotović, S., Veljović, M., Atanacković, M., Cvejić, J., ... & Leskošek-Čukalović, I. (2016). Extracts of medicinal plants as functional beer additives. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ*, 22(3), 301-308. <https://doi.org/10.2298/CICEQ150501044D>
- Donadini, G., & Porretta, S. (2017). Uncovering patterns of consumers' interest for beer: A case study with craft beers. *Food Research International*, 91, 183-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.043>
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., e Silva, J. B. D. A., & Schwan, R. F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1564-1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.010>
- Durán, G. M., & Mayor, J. A. A. (2020). La cadena de valor en el proceso agrícola de maracuyá. *ECA Sinergia*, 11(2), 108-118. [https://doi.org/10.33936/eca\\_sinergia.v11i2.2415](https://doi.org/10.33936/eca_sinergia.v11i2.2415)
- Eche, D. (2018). Análisis de la seguridad alimentaria en la agricultura familiar del norte del Ecuador. *Agroalimentaria*, 24(47), 91-112.
- Ele-Ekouna, J. P., Pau-Roblot, C., Courtois, B., & Courtois, J. (2011). Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*). *Carbohydrate Polymers*, 83(3), 1232-1239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.028>

- Eletta, O. A., Adeniyi, A. G., Ighalo, J. O., Onifade, D. V., & Ayandele, F. O. (2020). Valorisation of Cocoa (*Theobroma cacao*) pod husk as precursors for the production of adsorbents for water treatment. *Environmental Technology Reviews*, 9(1), 20-36. <https://doi.org/10.1080/21622515.2020.1730983>
- Enan, G., Abdel-Shafi, S., Ouda, S., & Negm, S. (2013). Novel antibacterial activity of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* z11 isolated from zabady. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 9(3), 174.
- Escobar, M., Trujillo, L., Angel, A., & Restrepo, F. (2008). Colombia en la era del alcohol carburante. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 3(2), 120–132.
- Esong, R. N., Etchu, K. A., Bayemi, P. H., & Tan, P. V. (2015). Effects of the dietary replacement of maize with sun-dried cocoa pods on the performance of growing rabbits. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 1411-1416. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0879-3>
- FAO. (2019). El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2019: Protegerse frente a la desaceleración y el debilitamiento de la economía (Vol. 2019). *Food & Agriculture Org.*
- Fasolato, L., Carraro, L., Facco, P., Cardazzo, B., Balzan, S., Taticchi, A., Andreani, N. A., Montemurro, F., Martino, M. E., Di Lecce, G., Toschi, T. G., & Novelli, E. (2016). Agricultural by-products with bioactive effects: A multivariate approach to evaluate microbial and physicochemical changes in a fresh pork sausage enriched with phenolic compounds from olive vegetation water. *International Journal of Food Microbiology*, 228, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.003>
- Fernández. (2008). Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de de aguardientes y rones. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6, 64–70.
- Figueroa, B., Ramona, M., & García, S. (2013). Nuevos alimentos, aceptación y efecto en el desarrollo agroalimentario según sexo. *Agroalimentaria*, 19(36), 87–112.
- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z. J., González-Ríos, O., Cocolin, L., & Suárez-Quiroz, M. L. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>
- Fiorentini, Â. M., Sant'Anna, E. S., Porto, A. C. S., Mazo, J. Z., & Franco, B. D. G. M. (2001). Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 42–46. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100010>
- Fioresi, F., Vieillard, J., Bargougui, R., Bouazizi, N., Fotsing, P. N., Woumfo, E. D., ... & Le Derf, F. (2017). Chemical modification of the cocoa shell surface using diazonium salts. *Journal of Colloid and Interface Science*, 494, 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.069>
- Firdaus, F., Desmiarti, R., Praputri, E., & Amir, A. (2022). Production of Cocoa Pulp Syrup by Utilizing Local Sugar Sources. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*, 6(2), 149-161.
- Flor, F. I., Macías-Zambrano, M., Napa-Vizueté, B., Vásquez-Cortez, L., Alvarado-Vásquez, K., Revilla-Escobar, K., ... & Vera-Chang, J. (2023). Inclusión de mucílago de cacao

(*Theobroma cacao*) como estabilizante en néctar de jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Agroindustrial Science*, 13(2), 75-81.  
<https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2023.02.03>

- Flores, M., Ruiz-Ramírez, J., Sánchez, E., Moreno, M., Castro, G., & Barboza, Y. (2011). Storage time and identification of lactic acid bacteria in vacuum packed ground beef meat. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 21(5), 425–433.
- Freire, D. (2018). Sistema de trazabilidad del cacao fino de aroma *Theobroma cacao* para el desarrollo de productos con valor agregado. *Revista Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación*, 5(Especial), 849–861.  
<http://45.238.216.13/ojs/index.php/EPISTEME/article/view/1549>
- Freire, E. S., Schwan, R. F., & Mororo, R. C. (1999). The cocoa pulp agroindustry and the use of its residues in Bahia: progress achieved in the last ten years. In *Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference* (pp. 1013-1020). Cocoa Producers Alliance.
- Fuentes López, A., García Martínez, E. M., & Fernández Segovia, I. (2013). Determinación de la capacidad de retención de agua (CRA). Método de prensado.  
<http://hdl.handle.net/10251/29835>
- Fuentes-Pérez, E. M. (2020). La industria alimentaria frente a la nueva normalidad post COVID-19. *CienciAmérica*, 9(2), 45-50.
- Gabbay, T. V., Silva da Costa, R., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Perego, P., Pinheiro Arruda, M. S., Carréra Silva Júnior, J. O., Converti, A., & Ribeiro Costa, R. M. (2019). Bioactive compounds and antioxidant potential for polyphenol-rich cocoa extract obtained by agroindustrial residue. *Natural Product Research*, 33(4), 589–592.  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1399381>
- García, C. M., Quirós-Roque, V. A., & Rosales-Mendoza, L. E. (2022). Los residuos generados en la producción de la industria azucarera en los últimos 25 años. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*. 8 (16), 1979–1991.  
<https://doi.org/10.377/ribcc.v8i16.15041>
- García Zapateiro, L. A., Florez Mendoza, C. I., & Marrugo Ligardo, Y. (2016). Elaboración y caracterización fisicoquímica de un vino joven de fruta de borjón (B patinoi Cuatrec). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, (52), 507-519.
- Geoecuador. (2008). *Contexto socioeconómico* (Vol. 2).
- Gibson, M.; Newsham, P. (2018). Chocolate/Cacao. In *Food Science and the Culinary Arts*; Gibson, M., Newsham, P., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; Chapter 17; pp. 341–352.
- Giovenzana, V., Beghi, R., & Guidetti, R. (2014). Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 142, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.017>
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., García, M., Chollet, S., & Valentin, D. (2016a). Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, 96, 358-367. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.10.002>

- Gómez-Corona, C., Lelievre-Desmas, M., Buendía, H. B. E., Chollet, S., & Valentin, D. (2016). Craft beer representation amongst men in two different cultures. *Food Quality and Preference*, 53, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.05.010>
- Gómez-Molina, R., Villanueva, S., & Henríquez, M. (2019). Tendencia mundial en la elaboración de productos derivados del cacao. *Revista Ingeniería UC*, 26(2), 213-222.
- González, J., Coronela, L., Lisa, L., Coronela, L., Lisa, L., Coronela, L., ... & Thoraille, Q. (2019). UHPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis of Flavonoids from Ethanolic Extracts of *Theobroma cacao* Husk in Cuba. *Open Access Library Journal*, 6(05), 1. <https://doi.org/10.4236/oalib.1105439>
- González-Leos, A., Del Angel-Del Angel, J. A., González-Castillo, J. L., Rodríguez-Durán, N., & Bustos-Vázquez, G. (2017). Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar. *CienciaUAT*, 11(2), 80. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v11i2.791>
- Gou, P., Comaposada, J., & Arnau, J. (2003). NaCl content and temperature effects on moisture diffusivity in the Gluteus medius muscle of pork ham. *Meat Science*, 63(1), 29-34. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00048-7)
- Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., & Prior, R. L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4057-4061. <https://doi.org/10.1021/jf060360r>
- Guirlanda, C. P., da Silva, G. G., & Takahashi, J. A. (2021a). Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product? *Future Foods*, 4(April), 100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>
- Gutiérrez, H. G., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Castellanos-Onorio, O. P., Alonso-Villegas, R., Rayas-Duarte, P., Cano-Sarmiento, C., Figueroa-Hernández, C. Y., & González-Rios, O. (2022). Yeasts as Producers of Flavor Precursors during Cocoa Bean Fermentation and Their Relevance as Starter Cultures: A Review. *Fermentation*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/fermentation8070331>
- Guzmán. (2019). Valuation and use of a new variety of barley for brewing craft beer. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 11(1), 81-95. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2018.01.001>
- Guzmán, J. H. (2020). Producción de cacao "*Theobroma cacao* L." fino o de aroma peruano: Agronegocio sostenible. *Alpha Centauri*, 1(1), 49-55. <https://doi.org/10.47422/ac.v1i1.6>
- Gyedu-Akoto, E., Yabani, D., Sefa, J., & Owusu, D. (2015). Natural skin-care products: the case of soap made from cocoa pod husk potash. *Advances in Research*, 4(6), 365-370. <https://doi.org/10.9734/AIR/2015/17029>
- HACH. (2020). Medición de turbidez total, turbidez permanente y turbidez fría de la cerveza.
- Hamoen, J. R., Vollebregt, H. M., & Van Der Sman, R. G. M. (2013). Prediction of the time evolution of pH in meat. *Food Chemistry*, 141(3), 2363-2372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.127>
- Heck, C. I., & De Mejia, E. G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72(9), R138-R151. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>

- Hennessey-Ramos, L., Murillo-Arango, W., Vasco-Correa, J., & Paz Astudillo, I. C. (2021). Enzymatic extraction and characterization of pectin from cocoa pod husks (*Theobroma cacao* L.) using Celluclast® 1.5 L. *Molecules*, 26(5), 1473. <https://doi.org/10.3390/molecules26051473>
- Heredia, N., Esteban, J., Aviña, D., Soto, L. S., & García, S. (2014). Productos cárnicos : principales patógenos y estrategias no térmicas de control Meat products : main pathogens and non - thermal control strategies. *Nacameh*, 8 (1), 20–42.
- Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A. M., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2018). Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240, 831-839. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.018>
- Hernández-Mendoza, A. G., Saldaña-Trinidad, S., Martínez-Hernández, S., Pérez-Sariñana, B. Y., & Láinez, M. (2021). Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 154, 106268. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106268>
- Hutomo, G.S., Marseno, D. W., Anggrahini, S. (2012). Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from pod husk of cacao (*Theobroma cacao* L.). *African Journal of Food Science*, 6 (6) (2012), pp. 180-185.
- Igbinadolor, R. O. (2009). Other tropical fruit vinegars. En: *Vinegars of the World* (pp. 261-271). Milano: Springer Milan.
- Igbinadolor, R. O., & Onilude, A. A. (2013). Bioprocess systems applied for the production of bio-ethanol from lignocellulosic biomass of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) and other agricultural residues: A review. *African Journal of Biotechnology*, 12(35), 5375-5388. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12890>
- INEC. (2020). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Metodología empleada. Folleto Informativo, 52. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2019/Metodologia ESPAC 2019.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Metodologia ESPAC 2019.pdf)
- INEC. (2021a). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2020*.
- INEC. (2021b). Módulo de Información Económica Ambiental de la de la Encuesta Estructural Empresarial (ENESEM), año 2019. In Ecuador en Cifras. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec>
- INEC. (2022). Encuesta de superficie y producción continua. ESPAC - Instituto Nacional de Estadística y Censos, 1–55. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2021/Principales resultados-ESPAC\\_2021.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Principales resultados-ESPAC_2021.pdf)
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2013). CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS-MEDICIÓN DE pH-MÉTODO DE REFERENCIA (IDT) NTE INEN-ISO 2917:2013.
- INEN 765. (2013). Carne y productos cárnicos. Bacterias coliformes y *Escherichia coli*. Norma Técnica Ecuatoriana. Instituto Ecuatoriano de Normalización. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/765-1R.pdf>
- INEN 767. (1985). *Carne y productos cárnicos mohos y levaduras* (Vol. 0767).

- INEN-2667. (2013). Norma técnica ecuatoriana microbiología. determinación e identificación de *Escherichia coli* O157 en alimentos de consumo humano.
- INEN-1529-15. (2009). Control microbiológico de los alimentos Salmonella. Método de detección.
- INEN 2346 (2015). *Carne y menudencias comestibles de animales de abasto*.
- INEN 2262. (2013). Bebidas alcoholicas. Cerveza. *Primera Revisión 2013-11*, 1–9. [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_2262-1.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2262-1.pdf)
- INEN 1529-8. (2016). Control microbiológico de los alimentos. detección y recuento de *Escherichia coli* presuntiva por la técnica del número más probable.
- ISO (1998). ISO 15214 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 °C.
- ISO4833. (2013). *Aerobios mesófilos ISO 4833-1:2013*. 2.
- Jansen, M., Guariguata, M. R., Raneri, J. E., Ickowitz, A., Chiriboga-Arroyo, F., Quaedvlieg, J., & Kettle, C. J. (2020). Food for thought: The underutilized potential of tropical tree-sourced foods for 21st century sustainable food systems. *People and Nature*, 2(4), 1006–1020. <https://doi.org/10.1002/pan3.10159>
- Jarrín-Chacón, J. P., Núñez-Pérez, J., Espín-Valladares, R. D. C., Manosalvas-Quiroz, L. A., Rodríguez-Cabrera, H. M., & Pais-Chanfrau, J. M. (2023). Pectin Extraction from Residues of the Cocoa Fruit (*Theobroma cacao* L.) by Different Organic Acids: A Comparative Study. *Foods*, 12(3), 590. <https://doi.org/10.3390/foods12030590>
- Junior, G. A. L., Tito, T. M., Marques, M. B. M., Da Silva, A. P. M., De Oliveira, M. P. M., Gomes, L. H., Coelho, I. da S., & Figueira, A. (2023). Fermentation box cleaning can impair cacao seed fermentation. *Food Science and Technology (Brazil)*, 43, 1–12. <https://doi.org/10.1590/fst.109322>
- Kamei, M., Nishimura, H., Takahashi, T., Takahashi, N., Inokuchi, K., Mato, T., & Takahashi, K. (2016). Anti-influenza virus effects of cocoa. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1150-1158. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7197>
- Karim, A. A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., & Abdullah, N. A. (2014). Antioxidant properties of cocoa pods and shells. *Malaysian Cocoa Journal*, 8(1), 49-56.
- Karim, A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Abd Gani, S. S., Zainudin, B. H., & Abdullah, N. A. (2014). Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-381>
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20, 861-875. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0121-7>
- Kausar, Hanan, E., Ayob, O., Praween, B., & Azad, Z. (2019). A review on functional ingredients in red meat products. *Bioinformation*, 15(5), 358–363. <https://doi.org/10.6026/97320630015358>
- Kaveh, S., Hashemi, S. M. B., Abedi, E., Amiri, M. J., & Conte, F. L. (2023). Bio-Preservation of Meat and Fermented Meat Products by Lactic Acid Bacteria Strains and Their Antibacterial Metabolites. *Sustainability*, 15(13), 10154.

<https://doi.org/10.3390/su151310154>

- Kayaputri, I. L., Djali, M., Sukri, N., & Fazaryasti, R. H. (2020, February). The antimicrobial effectiveness of cacao shell and cacao husk combination on inhibition of pathogenic bacteria in food products. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 443, No. 1, p. 012077). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/443/1/012077>
- Kim-Ngoc, V.-T., Cong-Hau, N., Bui-Phuc, T., & Thang, N. (2022). Quality Assessment During the Fermentation of Cocoa Beans: Effects of Partial Mucilage Removal. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 26(8), 1369–1374. <https://doi.org/10.4314/jasem.v26i8.8>
- Klis, V., Pühn, E., Jerschow, J. J., Fraatz, M. A., & Zorn, H. (2023). Fermentation of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Pulp by *Laetiporus persicinus* Yields a Novel Beverage with Tropical Aroma. *Fermentation*, 9(6), 533. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060533>
- Koido, K., Takeuchi, H., & Hasegawa, T. (2018). Life cycle environmental and economic analysis of regional-scale food-waste biogas production with digestate nutrient management for fig fertilisation. *Journal of Cleaner Production*, 190, 552-562. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.165>
- Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., Brou, K., Boulanger, R., & Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>
- Konstantas, A., Jeswani, H. K., Stamford, L., & Azapagic, A. (2018). Environmental impacts of chocolate production and consumption in the UK. *Food Research International*, 106, 1012-1025. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.042>
- Koppel, K., Anderson, E. L., & Chambers IV, E. (2015). Influence of processing on pomegranate (*Punica granatum* L.) juice flavor and aroma. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1066-1071. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6799>
- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- LaCie. 2006. Libro blanco de la gestión del color. 3. Espacios de color y conversión de colores. Disponible en <Disponible en [http://www.prodesgrafica.com/userfiles/file/LACIE%20colormangement\\_es.pdf](http://www.prodesgrafica.com/userfiles/file/LACIE%20colormangement_es.pdf)
- Laconi, E. B., & Jayanegara, A. (2015). Improving nutritional quality of cocoa pod (*Theobroma cacao*) through chemical and biological treatments for ruminant feeding: in vitro and in vivo evaluation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(3), 343. <https://doi.org/10.5713/ajas.13.0798>
- Lagunes, S., Loiseau, G., Luis, J., Barel, M., & Guiraud, J. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>
- Lateef, A., Oloke, J. K., Gueguim Kana, E. B., Oyenyi, S. O., Onifade, O. R., Oyeleye, A. O., ... & Oyelami, A. O. (2008). Improving the quality of agro-wastes by solid-state

- fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2369-2374. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9749-8>
- Lateef, A., Azeez, M. A., Asafa, T. B., Yekeen, T. A., Akinboro, A., Oladipo, I. C., ... & Beukes, L. S. (2016). Cocoa pod husk extract-mediated biosynthesis of silver nanoparticles: its antimicrobial, antioxidant and larvicidal activities. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 6, 159-169. <https://doi.org/10.1007/s40097-016-0191-4>
- Leal, G. A., Gomes, L. H., Efraim, P., De Almeida Tavares, F. C., & Figueira, A. (2008). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 788–798. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00405.x>
- Lecumberri, E., Goya, L., Mateos, R., Alía, M., Ramos, S., Izquierdo-Pulido, M., & Bravo, L. (2007). A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*, 23(4), 332-341. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.01.013>
- Lee, S. P., & Kim, C. S. (2000). Characterization of Kombucha beverages fermented with various teas and tea fungus. *Journal of Food Science and Nutrition*, 5(3), 165-169.
- Lee, A. H., Neilson, A. P., O’Keefe, S. F., Ogejo, J. A., Huang, H., Ponder, M., Chu, H. S. S., Jin, Q., Pilot, G., & Stewart, A. C. (2019). A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. *European Food Research and Technology*, 245(2), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3171-8>
- León, M. (2016). Ecuador, 1990-2014: Crecimiento, pobreza, productividad y cambio estructural. *Estudios Temáticos-INEC*, 58-88.
- León, M., Orduz, A., & Velandia, M. (2018). Composición fisicoquímica de la carne de ovejo, pollo, res y cerdo. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 15(2), 62-75.
- Lelièvre-Desmas, M., Chollet, S., Abdi, H., & Valentin, D. (2015). Becoming a beer expert: Is simple exposure with feedback sufficient to learn beer categories? *Acta Psychologica*, 161, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2015.08.003>
- Llerena Silva, W. M., Samaniego, I. R., Vallejo, C., Arreaga, A., Zhunio, B., Coronel, Z., ... & Carrillo, W. (2023). Profile of bioactive components of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products from Ecuador and evaluation of their antioxidant activity. *Foods* 2023, 12, 2583. <https://doi.org/10.3390/foods12132583>
- Lombardelli, C., & Esti, M. (2022). Natural colorants from vegetable food waste : Recovery , regulatory aspects , and stability — A review. *Food Science and Food Safety*, November 2021, 2715–2737. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12951>
- López Alba, A., & Botello Peñaloza, H. A. (2022). Internet use and labor market: evidence of job search in Ecuador 2018-2019. *Tendencias*, 23(1), 252-276.
- López, J. E., Arroyave, C., Aristizábal, A., Almeida, B., Builes, S., & Chavez, E. (2022). Reducing cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* using biochar: basis for scaling-up to field. *Heliyon*, 8(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09790>
- López, F., & Segovia, F. (2015). *Determinación de la capacidad de retención de agua ( CRA ). Método de prensado* (pp. 1–6).

- Lu, F., Rodriguez-Garcia, J., Van Damme, I., Westwood, N. J., Shaw, L., Robinson, J. S., ... & Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>
- Lubis, M., Gana, A., Maysarah, S., Ginting, M. H. S., & Harahap, M. B. (2018, February). Production of bioplastic from jackfruit seed starch (*Artocarpus heterophyllus*) reinforced with microcrystalline cellulose from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) using glycerol as plasticizer. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 309, p. 012100). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/309/1/012100>
- Macias, A., Pérez-parra, J., & Torres-puentes, J. (2022). Pasado , presente y perspectiva del Bioetanol en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, 15, 38–51.
- MAG. (2019). *Plan estratégico Institucional 2017-2021* (p. 167).
- MAG. (2021). *PRODUCTIVIDAD AGRÍCOLA DE ECUADOR - 2021*. [http://sipa.agricultura.gob.ec/biblioteca/rendimientos/informe\\_productividad\\_agricola\\_2021.pdf](http://sipa.agricultura.gob.ec/biblioteca/rendimientos/informe_productividad_agricola_2021.pdf)
- Makinde, O. J., Okunade, S. A., Opoola, E., Sikiru, A. B., Ajide, S. O., & Elaigwu, S. (2019). Exploration of cocoa (*Theobroma cacao*) by-products as valuable potential resources in livestock feeds and feeding systems. In: *Theobroma Cacao-Deploying Science for Sustainability of Global Cocoa Economy*, 1-14.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 337-347. <https://doi.org/10.1079/PNS2003248>
- Malting, C. (2022). We make your brewing dreams come true. In Castle Malting.
- Marques, D. R., Cassis, M. A., Quelhas, J. O. F., Bertozzi, J., Visentainer, J. V., Oliveira, C. C., & Monteiro, A. R. G. (2017). Characterization of craft beers and their bioactive compounds. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1747-1752. <https://doi.org/10.3303/CET1757292>
- Martin, M. Á., Goya, L., & Ramos, S. (2016). Antidiabetic actions of cocoa flavanols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(8), 1756-1769. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500961>
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 390-399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Martínez-Ángel, J. D., Villamizar-Gallardo, R. A., & Ortíz-Rodríguez, O. (2015). Characterization and evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk as a renewable energy source. *Agrociencia*, 49(3), 329-345.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>

- Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Mugerza, B., Moulay, L., & Fiszman, S. M. (2011). Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 729-736. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.035>
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P. J., Saels, V., Struyf, N., ... & Verstrepen, K. J. (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS One*, 8(12), e81559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559>
- Medina-Jaramillo, C., Quintero-Pimiento, C., Gómez-Hoyos, C., Zuluaga-Gallego, R., & López-Córdoba, A. (2020). Alginate-edible coatings for application on wild andean blueberries (*Vaccinium meridionale* swartz): Effect of the addition of nanofibrils isolated from cocoa by-products. *Polymers*, 12(4), 824. <https://doi.org/10.3390/polym12040824>
- Medoro, C., Cianciabella, M., Camilli, F., Magli, M., Gatti, E., & Predieri, S. (2016). Sensory profile of Italian craft beers, beer taster expert versus sensory methods: A comparative study. *Food and Nutrition Sciences*, 7(06), 454. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.76047>
- Melo, G. V., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 7, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001>
- Molina, A. M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J. H., Pretorius, I. S., & Agosin, E. (2009). Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, 117(2), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.116>
- Mollea, C., Chiampo, F., & Conti, R. (2008). Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry*, 107(3), 1353-1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.006>
- Morante-Carriel, L., Abasolo, F., Bastidas-Caldes, C., Paz, E. A., Huaquipán, R., Díaz, R., ... & Quiñones, J. (2023). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cocoa Mucilage and Meat: Exploring Their Potential as Biopreservatives for Beef. *Microbiology Research*, 14(3), 1150-1167. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14030077>
- Moreira-Macías, R. W., Reinoso-Baque, I. M., Proaño-Molina, M. Y., Durazno-Delgado, L. A., Rosero-Rojas, J. A., & Díaz-Camposano, E. G. (2023). Influencia de la leche de soya, pasta de cacao y distintos edulcorantes en la evaluación sensorial de una bebida funcional. *Revista Científica INGENIAR: Ingeniería, Tecnología e Investigación*. 6(12), 164-176. <https://doi.org/10.46296/ig.v6i12.0109>
- Moreno, S., Morán, E., Quijije, I., & Ochoa, D. (2021). Mucílago de Theobroma Cacao L. como base para un bioantimicrobiano mezclado con dos ácidos débiles: alternativas ecológicas. *Ecuadorian Science Journal*, 5(4), 98–108. <https://doi.org/10.46480/esj.5.4.173>
- Muharja, M., Darmayanti, R. F., Fachri, B. A., Palupi, B., Rahmawati, I., Rizkiana, M. F., ... & Halim, A. (2023). Biobutanol production from cocoa pod husk through a sequential green method: Depectination, delignification, enzymatic hydrolysis, and extractive fermentation. *Bioresource Technology Reports*, 21, 101298. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101298>

- Muhalidin, B. J., Osman, F. A., Muhamad, R., Che Wan Sapawi, C. W. N. S., Anzian, A., Voon, W. W. Y., & Hussin, A. S. (2019). Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. *International Food Research Journal*, 26(2).
- Munekata, P. E. S., Nieto, G., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2020). Phenolic compounds obtained from *Olea europaea* by-products and their use to improve the quality and shelf life of meat and meat products—a review. *Antioxidants*, 9(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antiox9111061>
- Murillo, S. M., Ponce-rosas, F. C., & Huamán-murillo, M. D. J. (2020). Características físico-químicas, compuestos bioactivos y contenido de minerales en la harina de cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Manglar*, 17(1), 67–73.
- Muzaifa, M., Rohaya, S., Nilda, C., & Harahap, K. R. (2022, January). Kombucha Fermentation from Cascara with Addition of Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*): Analysis of Alcohol Content and Total Soluble Solid. In *International Conference on Tropical Agrifood, Feed and Fuel* (ICTAFF 2021) (pp. 125-129). Atlantis Press. <https://doi.org/10.2991/absr.k.220102.020>
- Najafpour, A., Khorrami, A. R., Azar, P. A., & Tehrani, M. S. (2020). Study of heavy metals biosorption by tea fungus in Kombucha drink using Central Composite Design. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103359. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103359>
- Nandha, M. C., & Shukla, R. M. (2023). Exploration of probiotic attributes in lactic acid bacteria isolated from fermented *Theobroma cacao* L. fruit using in vitro techniques. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1274636>
- Narain, N., Bora, P. S., Holschuh, H. J., & Da S, M. V. (2001). Physical and chemical composition of carambola fruit (*Averrhoa carambola* L.) at three stages of maturity. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(3), 144-148.
- Nardini, M., & Foddai, M. S. (2020). Phenolics profile and antioxidant activity of special beers. *Molecules*, 25(11), 2466. <https://doi.org/10.3390/molecules25112466>
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2020). Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chemistry*, 305, 125437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>
- Nazir, N., & Sayuti, K. (2019, November). Application of Pectin Extracted from Cocoa Pod in the Production of Edible Film. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 347, No. 1, p. 012060). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/347/1/012060>
- Neto, B. A., Bonomo, R. C. F., Fontan, R. D. C. I., Ferreira, A. C. R., Gonçalves, G. R. F., & Mello, D. L. N. (2016). Physicalchemical characterization and thermophysical properties of cocoa honey. *Revista Geintec-Gestao Inovacao e Tecnologias*, 6(1), 2944-2953. <https://doi.org/10.7198/S2237-0722201600010016>
- Nguyen, Q. V., & Chuyen, H. V. (2020). Processing of herbal tea from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Effects of drying temperature and brewing conditions on total soluble solid, phenolic content, antioxidant capacity and sensory quality. *Beverages*, 6(1), 2. <https://doi.org/10.3390/beverages6010002>

- NOM-186. (2020). NORMA Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2013, Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. In DOF - Diario Oficial de la Federación. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013)
- Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M. E., & Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of Plantago major seed mucilage containing Citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1625-1639. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2137>
- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., & Mothibe, K. J. (2012). In vitro hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. *Food & Function*, 3(10), 1044-1050. <https://doi.org/10.1039/C2FO30091E>
- NTE INEM 340. (1994). BEBIDAS ALCOHOLICAS. DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO.
- NTE INEM 349. (1978). Norma Técnica BEBIDAS ALCOHOLICAS DETERMINACION DE LA DENSIDAD. [file:///C:/Users/ACER/Downloads/nte\\_inem\\_341.pdf](file:///C:/Users/ACER/Downloads/nte_inem_341.pdf)
- Oddoye, E.O.K., Agyente-Badu, C.K., Gyedu-Akoto, E. (2013). Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. In: Watson, R., Preedy, V., Zibadi, S. (eds) *Chocolate in Health and Nutrition. Nutrition and Health*, vol 7. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_3)
- OFFER, G. (1988). The structural basis of water-holding in meat. Part 2. In: Lawrie R, editor. Development in meat science. Vol. 4. London, UK: Elsevier Science Publications. pp. 173–243.
- Okiyama, D. C., Soares, I. D., Toda, T. A., Oliveira, A. L., & Rodrigues, C. E. (2019). Effect of the temperature on the kinetics of cocoa bean shell fat extraction using pressurized ethanol and evaluation of the lipid fraction and defatted meal. *Industrial Crops and Products*, 130, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.063>
- Olmos, X. (2017). Sostenibilidad ambiental de las exportaciones agroalimentarias. *CEPAL*, 71. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/43288>
- Omer, M. K., Álvarez-Ordoñez, A., Prieto, M., Skjerve, E., Asehun, T., & Alvseike, O. A. (2018). A systematic review of bacterial foodborne outbreaks related to red meat and meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(10), 598-611. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2393>
- Oñate, J. A., Flores Torres, X. F., & Ordoñez García, J. E. (2021). Identificación de sectores agroindustriales alimenticios en el Ecuador que han sido afectados por la pandemia COVID-19. *Recimundo*, 5(4), 65–73. [https://doi.org/10.26820/recimundo/5.\(4\).oct.2021.65-73](https://doi.org/10.26820/recimundo/5.(4).oct.2021.65-73)
- Orellana, J. A., & Laivay, T. (2018). Uso e importancia de los recursos naturales y su incidencia en el desarrollo turístico. Caso Cantón Chilla, El Oro, Ecuador Use and importance of the natural resources and their impact on tourism development. Case of Chilla Canton, El Oro, Ecuador. *Revista Interamericana de Ambiente y Turismo*, 14, (1). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-235X2018000100065>

- O'sullivan, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5-6), 593-604. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01457-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8)
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.021>
- Pacheco-Montealegre, M. E., Dávila-Mora, L. L., Botero-Rute, L. M., Reyes, A., & Caro-Quintero, A. (2020). Fine resolution analysis of microbial communities provides insights into the variability of cocoa bean fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00650>
- Paidari, S., Zamindar, N., Tahergorabi, R., Kargar, M., Ezzati, S., Shirani, N., & Musavi, S. H. (2021). Edible coating and films as promising packaging: a mini review. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4205-4214. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00979-7>
- Pakroo, S., Tarrah, A., Takur, R., Wu, M., Corich, V., & Giacomini, A. (2022). *Limosilactobacillus fermentum* ING8, a potential multifunctional non-starter strain with relevant technological properties and antimicrobial activity. *Foods*, 11(5), 703. <https://doi.org/10.3390/foods11050703>
- Pantoja, A. J. (2015). Efecto del pretratamiento químico y enzimático en la deslignificación de biomasa agroindustrial típica del cauca. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol, 13*(1), 45–53.
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7698-7714. <https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Socol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 512-542. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018>
- Pérez-Sariñana, B. Y., De León-Rodríguez, A., Saldaña-Trinidad, S., & Joseph, S. P. (2015). Optimization of bioethanol production from coffee mucilage. *BioResources*, 10(3), 4326-4338.
- Perlo. (2020). Uso de extracto de romero y ácido ascórbico en la conservación refrigerada de carne de cerdo. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 31, 208–227.
- Pethick, D. W., Fergusson, D. M., Gardner, G. E., Hocquette, J. F., Thompson, J. M., & Warner, R. (2005). Muscle metabolism in relation to genotypic and environmental influences on consumer defined quality of red meat. In *Indicators of milk and beef quality* (pp. 95-110). Wageningen Academic.
- Petravić-Tominac, V., Mesihović, A., Mujadžić, S., Lisičar, J., Oros, D., Velić, D., ... & Petrović, Z. (2013). Production of blackberry wine by microfermentation using commercial yeasts Fermol Rouge® and Fermol Mediterranée®. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(1), 49-55. <https://hrcak.srce.hr/99321>

- Pholsin, R., Shiekh, K. A., Jafari, S., Kijpatanasilp, I., Nan, T. N., Suppavorasatit, I., & Assatarakul, K. (2024). Impact of pectin edible coating extracted from cacao shell powder on postharvest quality attributes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit during storage. *Food Control*, 155, 110023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110023>
- Pilligua, R. L., Barre-Zambrano, R. L., Mendoza-González, A. E., Lavayen-Delgado, E., & Mero-Santana, R. (2021). Influencia del mucilago de cacao (*Theobroma cacao*) en las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza artesanal. *Revista ESPAMCIENCIA*, 12(1), 25-32. <https://doi.org/10.51260/revista>
- Pino Hurtado, M. S., Gallardo Aguilar, I., & Pérez Pentón, M. (2018). Estudio experimental de las etapas de maceración y fermentación para la obtención de cerveza a partir de malta de Sorgo. *Revista Centro Azúcar*, 45(3), 52–64. <http://scielo.sld.cu/pdf/caz/v45n3/caz06318.pdf>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922-935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- Poma. (2022). Diseño de un modelo de cadena de valor para los agronegocios en la provincia de El Oro. *Digital Publisher*, 7(4), 228–240.
- Quicazán, M. C., Sandoval, A., & Padilla, G. (2017). Evaluación de la fermentación de bebida de soya con un cultivo láctico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3(2), 92–99.
- Rangel, C. J., Hernández, M. A., Mosquera, J. D., Castro, Y., Cabeza, I. O., & Acevedo, P. A. (2021). Hydrogen production by dark fermentation process from pig manure, cocoa mucilage and coffee mucilage. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00618-z>
- Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta.
- Rengifo, L. I., & Ordoñez, E. S. (2010). Efecto de la temperatura en la capacidad de retención de agua y pH en carne de res, cerdo, pollo, ovino, conejo y pescado paco. *Revista ECIPerú*, 7(2), 1-9.
- Ripoll, G., Panea, B., & Albertí, P. (2012). Apreciación visual de la carne bovina y su relación con el espacio de color CIELab. *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 108(2), 222–232.
- Rocchetti, M. T., Russo, P., Capozzi, V., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2021). Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key factors underlying its probiotic action. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12076. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>
- Rodríguez, Posada Izquierdo, G., Valero Díaz, A., Torres Navarrete, E., Torres Navarrete, Y., & Díaz Ocampo, R. (2021). Valoración de baba de cacao (mucílago) no utilizada en el cantón Quevedo - Ecuador. *Revista Científica Ciencia y Tecnología*, 21(32). <https://doi.org/10.47189/rcct.v21i32.489>
- Rodríguez. (2019). La seguridad alimentaria nutricional en el Perú: disponibilidad agroalimentaria. *Puriq*, 1(2), 153–163. <https://doi.org/10.37073/puriq.1.02.33>

- Rodríguez-Villacis, D. H., & Hernández-Monzón, A. (2017). Desarrollo de una bebida fermentada de suero con la adición de jugo de Aloe vera y pulpa de fruta. *Tecnología Química*, 37(1), 40-50.
- Roini, C., Limatahu, N. A., & Hartati, T. M. (2019, May). Characterization of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L) from South Halmahera as an alternative feedstock for bioethanol production. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 276, No. 1, p. 012038). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/276/1/012038>
- Rojas, J. C., Ramírez, K. G., Velasquez, P. E., Acevedo, P., & Santis, A. (2020). Evaluation of bio-hydrogen production by dark fermentation from Cocoa waste mucilage. *Chemical Engineering Transactions*, 79(July), 283–288. <https://doi.org/10.3303/CET2079048>
- Rojas-Rojas, K., Hernández-Aguirre, C., & Mencía-Guevara, A. (2021). Biochemical transformations of cocoa (*Theobroma cacao* L.) during a controlled fermentation process. *Agronomía Costarricense*, 45(1), 53-65.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., & Zeppa, G. (2019). Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, 11(4), 867. <https://doi.org/10.3390/nu11040867>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*, 12(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Romero Cortes, T., Cuervo-Parra, J. A., Jose Robles-Olvera, V., Rangel Cortes, E., & Lopez Perez, P. A. (2018). Experimental and kinetic production of ethanol using mucilage juice residues from cocoa processing. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 16(11), 20170262.
- Romero. (2020). Observatorio de Commodities 2020 - Cacao. In *Ministerio De Desarrollo Agrario Y Riesgo*.
- Rösler, F., Kreyenschmidt, J., & Ritter, G. (2021). Recommendation of good practice in the food-processing industry for preventing and handling food loss and waste. *Sustainability* (Switzerland), 13(17), 1–30. <https://doi.org/10.3390/su13179569>
- Rossin, D., Barbosa-Pereira, L., Iaia, N., Testa, G., Sottero, B., Poli, G., ... & Biasi, F. (2019). A dietary mixture of oxysterols induces in vitro intestinal inflammation through TLR2/4 activation: The protective effect of cocoa bean shells. *Antioxidants*, 8(6), 151. <https://doi.org/10.3390/antiox8060151>
- Saavedra, O. L., Durán, D., Cabezas, J., Hernández, I., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2021). Cellulose biosynthesis using simple sugars available in residual cacao mucilage exudate. *Carbohydrate Polymers*, 274(September), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118645>
- Sabahi, S., Abbasi, A., & Mortazavi, S. A. (2022). Characterization of cinnamon essential oil and its application in *Malva sylvestris* seed mucilage edible coating to the enhancement of the microbiological, physicochemical and sensory properties of lamb meat during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 133(2), 488-502. <https://doi.org/10.1111/jam.15578>
- Sakia, T., Camara, F., Hermann Coulibaly, W., & Avit Maxwell Beugré, G. (2022). Assessment of physicochemical, biochemical and functional properties of mucilage cocoa juice during storage at room temperature. *Trends Journal of Sciences Research*, 1(1), 10–26. <https://doi.org/10.31586/ojfn.2022.186>

- Salim, M. A. (2013). The time variation of *Saccharomyces cerevisiae* inoculation in simultaneous saccharification and fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod for bioethanol production. *Journal of Asian Scientific Research*, 3(3), 268.
- Santana, N. B., Dias, J. C. T., Rezende, R. P., Franco, M., Oliveira, L. K. S., & Souza, L. O. (2018). Production of xylitol and bio-detoxification of cocoa pod husk hemicellulose hydrolysate by *Candida boidinii* XM02G. *PLoS One*, 13(4), e0195206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195206>
- Samuel, Y. K. C. (2006). Crude gum from cocoa of Malaysian origin: Part 1: Rheological Properties. *Malaysian Cocoa Journal*, 2, 28-31.
- San, C., Wei, E., Chan, C., Wai, C., & Wai, C. (2022). Antioxidant and sensory evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) tea formulated with cocoa bean hull of different origins. *Future Foods*, 5, 100108. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100108>
- Sánchez, A.M., Gutiérrez, A., Muñoz, J., & Rivera, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Tumbaga*, 5, 61–91. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/194/163>
- Sánchez, Á., Naranjo González, J. A., Córdova Avalos, V., Ávalos de la Cruz, D. A., & Zaldívar Cruz, J. M. (2016). Caracterización bromatológica de los productos derivados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Chontalpa, Tabasco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(SPE14), 2817-2830.
- Sánchez-Olaya, D. M., Rodríguez Perez, W., Castro Rojas, D. F., & Trujillo Trujillo, E. (2019). Respuesta agronómica de mucilago de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia En Desarrollo*, 10(2), 43–58. <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.7958>
- Sansone, R., Ottaviani, J. I., Rodríguez-Mateos, A., Heinen, Y., Noske, D., Spencer, J. P., ... & Heiss, C. (2017). Methylxanthines enhance the effects of cocoa flavanols on cardiovascular function: randomized, double-masked controlled studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(2), 352-360.
- Santamaría, M. P., Martín, R. L., Viguera, A. R. G., & Domínguez, E. G. E. (1995). Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica. *Zubía*, (7), 137-149.
- Santos, C. O., Bispo, E. D., de Santana, L. R. R., & de Carvalho, R. D. S. (2014). Use of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L.) for diet jelly preparation: An alternative technology. *Revista Brasileira do Fruticultura*, 36, 640-648. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-042/13>
- Saunshi, Y. B., Sandhya, M. V. S., Rastogi, N. K., & Murthy, P. S. (2020). Starter consortia for on-farm cocoa fermentation and their quality attributes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(3), 272–280. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1689508>
- Schabo, D. C., Martins, L. M., Maciel, J. F., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Schaffner, D. W., & Magnani, M. (2020). Production of aflatoxin B1 and B2 by *Aspergillus flavus* in inoculated wheat using typical craft beer malting conditions. *Food Microbiology*, 89, 103456. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103456>
- Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M. Á., Muguerza, B., Ramón, D., & Ríos, J. L. (2010). Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43(6), 1614-1623. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.032>

- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Segobia, S. A. (2022). Evaluación de la adición de centeno (*Secale cereale*) en la formulación de cerveza artesanal Belgian Pale Ale. *Enfoque UTE*, 13(3). <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.830>
- Seman, D. L., Boler, D. D., Carr, C. C., Dikeman, M. E., Owens, C. M., Keeton, J. T., ... & Powell, T. H. (2017). AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION (AMSA) MEAT SCIENCE LEXICON. Nurturing Locally, Growing Globally, 315. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-860-5>
- Sen, E., & Uguzdogan, E. (2022). Brewed black tea waste (*Camellia sinensis* L.) as alternative pectin source. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(5), 4110-4120. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01515-x>
- Sharma, C., Bhardwaj, N. K., & Pathak, P. (2021). Static intermittent fed-batch production of bacterial nanocellulose from black tea and its modification using chitosan to develop antibacterial green packaging material. *Journal of Cleaner Production*, 279, 123608. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123608>
- Signorini, M. (2007). Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel. *Nacameh*, 1, 26–40.
- Silva, H. G. D. O., Pires, A. J. V., Silva, F. F. D., Veloso, C. M., Carvalho, G. G. P. D., Cezário, A. S., & Santos, C. C. (2005). Effects of feeding cocoa meal (*Theobroma cacao* L.) and palm kernel cake (*Elaeis guineensis*, Jacq) on milk intake and yield for lactating goats. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1786-1794.
- Silva, E. N. D., Ramos, D. D. C., Menezes, L. M., Souza, A. O. D., & Lannes, S. C. D. S. (2014). Nutritional value and antioxidant capacity of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L.). *Food Science and Technology*, 34, 755-759. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6447>
- Smullen, J., Koutsou, G. A., Foster, H. A., Zumbé, A., & Storey, D. M. (2007). The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 41(5), 342-349. <https://doi.org/10.1159/000104791>
- Soares, T. F., & Oliveira, M. B. P. (2022). Cocoa by-products: characterization of bioactive compounds and beneficial health effects. *Molecules*, 27(5), 1625. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>
- Sobamiwa, O., & Longe, O. G. (1994). Utilization of cocoa-pod pericarp fractions in broiler chick diets. *Animal Feed Science and Technology*, 47(3-4), 237-244. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90127-9)
- Solanoo, L. G., Alamilla-Beltrán, L., & Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 30. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153>
- Solórzano, R. A., Rivadeneira, F. A. M., Zambrano, P. A. V., & Zambrano, R. L. B. (2019). Monitoreo del proceso fermentativo de cuatro licores de frutas (*Passiflora edulis*, *Citrus cinensis*, *Citrus nobilis* y *Citrus máxima*). *Revista Arbitrada Interdisciplinaria Koinonía*, 4(8), 752-764.

- Sotomayor, I. A., Tarqui-Freire, O. M., Loor-Solórzano, R. G., Amores-Puyutaxi, F. M., & Motamayor, J.-C. (2017). Variación fenotípica y selección de genotipos de cacao de alto rendimiento en Ecuador. *Espamciencia*, 8(2), 23–33. <http://investigacion.esпам.edu.ec/index.php/Revista/article/view/258>
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H. M., Van Landschoot, A., ... & Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PloS one*, 9(4), e95384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>
- Suhartini, S., Hidayat, N., & Hadi, M. W. R. (2021, April). Co-digestion of cocoa pods and cocoa leaves: effect of C/N ratio to biogas and energy potential. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 733, No. 1, p. 012139). IOP Publishing.
- Sumba, R. Y., Saltos, G. R., Rodríguez, C. A., & Tumbaco, Z. L. (2020). El desempleo en el Ecuador: causas y consecuencias [Unemployment in Ecuador: causes and consequences]. *Polo Del Conocimiento*, 5(10), 774–797. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i10.1851>
- Švarc-Gajić, J., Brezo-Borjan, T., Dzedik, V., Rodrigues, F., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2023). ESG approach in the valorization of cocoa (*Theobroma cacao*) by-products by subcritical water: Application in the cosmetic industry. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 31, 100908. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100908>
- Syahza, A., Bakce, D., Irianti, M., Asmit, B., & Nasrul, B. (2021). Development of Superior Plantation Commodities Based on Sustainable Development. *International Journal of Sustainable Development & Planning*, 16(4). <https://doi.org/10.18280/ijstdp.160408>
- Takrama, J. F., Kumi, W. O., Otoo, G., Addo, K., & Camu, N. (2015). Optimization of cocoa pulp juice fermentation with yeast starter cultures of cocoa heap fermentations. *Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 1(3), 22–33.
- Taylor, A. J., Cardenas-Torres, E., Miller, M. J., Zhao, S. D., & Engeseth, N. J. (2022). Microbes associated with spontaneous cacao fermentations-A systematic review and meta-analysis. *Current Research in Food Science*, 5, 1452-1464. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.08.008>
- Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortíz, A., & González-Delgado, Á. (2022). Adsorption study of continuous heavy metal ions (Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>) removal using cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husks. *Materials*, 15(19), 6937. <https://doi.org/10.3390/ma15196937>
- Tĩnh, N. T. T., An, N. T., Hòa, H. T. T., & Tươi, N. T. (2016). A study of wine fermentation from mucilage of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Dalat University Journal of Science*, 387-397. [https://doi.org/10.37569/DalatUniversity.6.3.83\(2016\)](https://doi.org/10.37569/DalatUniversity.6.3.83(2016))
- Tomasevic, I., Djekic, I., Font-i-Furnols, M., Terjung, N., & Lorenzo, J. M. (2021). Recent advances in meat color research. *Current Opinion in Food Science*, 41, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.012>
- Tougan, P. U., Dahouda, M., Salifou, C. F. A., Ahounou, S. G. A., Kpodekon, M. T., Mensah, G. A., ... & Karim, I. Y. (2013). Conversion of chicken muscle to meat and factors affecting chicken meat quality: a review. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 3(8), 1-20.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020).

- Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2050-2070. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>
- Umaraw, P., & Verma, A. K. (2017). Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1270-1279. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.986563>
- Valadez-Carmona, L., Plazola-Jacinto, C. P., Hernández-Ortega, M., Hernández-Navarro, M. D., Villarreal, F., Necoechea-Mondragón, H., ... & Ceballos-Reyes, G. (2017). Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 378-386. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012>
- Valadez-Carmona, L., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2018). Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 131, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.011>
- Valenzuela, A., & Valenzuela, R. (2015). La innovación en la industria de alimentos : Historia de algunas innovaciones y de sus innovadores. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(4), 404–408. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000400013>
- Valladares-Diestra, K. K., de Souza Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2022). A biorefinery approach for pectin extraction and second-generation bioethanol production from cocoa pod husk. *Bioresource Technology*, 346, 126635. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126635>
- Vallejo, Fabián Vera Chang, J., Gustavo Quintana Zamora, J., Carolina Verdezoto Quinatoa, D., Estefanía Cajas Anchundia, L., Yanina Mendoza Gar-cía, T., Arturo Ruiz Mora, C., Chone, V., & Domingo de los Tsáchilas -Ecuador, S. (2018). Bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) de dos variedades. *Revista de Investigación Talentos V*, 1(1), 59–68.
- Vásquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V., Vandenberghe, L. P., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., ... & Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 90, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vásquez, C. M., & Medina, C. M. (2010). Viscosidad cinemática y turbidez optimizadas en jugo mixto de “poro poro” y “caña de azúcar”. *UCV-Scientia*, 2(1), 47-57. <https://doi.org/10.18050/revucv-scientia.v2i1.831>
- Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131. <https://doi.org/10.3390/nu2111106>
- Velasco, V., Bravo, P., Williams, P., Campos, J., Astudillo, R., Melín, P., Velasco, V., Bravo, P., Williams, P., Campos, J., Astudillo, R., & Melín, P. (2017). Estabilidad durante el almacenamiento de carne de pollos alimentados con orégano seco (*Origanum vulgare* L.) en la dieta. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(1), 28–38. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902017005000104>

- Vélez, Y. M. L., & Moyano, S. F. H. (2023). Aprovechamiento y evaluación de una bebida no alcohólica a base de mucílago y placenta de *Theobroma cacao* L, *Ananas comosus* y *Mangifera indica*. *Revista InGenio*, 6(1), 10-19. <https://doi.org/10.18779/ingenio.v6i1.559>
- Vera-Loor, J. E., Cedeño-Palacios, N. B., & Mera-Vélez, S. A. (2020). Elaboración de vinagre de vino a partir del mucílago y exudado de cacao criollo (*theobroma cacao* L.): Artículo de revisión bibliográfica. *Revista Científica INGENIAR: Ingeniería, Tecnología e Investigación*. 3(6), 2-13. <https://doi.org/10.46296/ig.v3i6.0014>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Favero, G. R., de Carvalho, J. C., Goés-Neto, A., ... & Soccol, C. R. (2021). Global cocoa fermentation microbiome: revealing new taxa and microbial functions by next generation sequencing technologies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03079-2>
- Villacreces, S., Blanco, C. A., & Caballero, I. (2022). Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Bioscience*, 45, 101495. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101495>
- Volzing, K., Borrero, J., Sadowsky, M. J., & Kaznessis, Y. N. (2013). Antimicrobial peptides targeting Gram-negative pathogens, produced and delivered by lactic acid bacteria. *ACS Synthetic Biology*, 2(11), 643-650. <https://doi.org/10.1021/sb4000367>
- Vriesmann, L. C., Amboni, R. D. D. M. C., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011a). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1173-1181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.004>
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011). Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1230-1236. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.009>
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2012). Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. *LWT*, 49(1), 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.018>
- Vriesmann, L. C., & Petkowicz, C. L. (2013). Highly acetylated pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) forms gel. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.010>
- Wang, S., Zhao, C., Wang, Y., Li, C., Sun, Z., Liu, X., ... & Fang, W. (2022). Effects of crystal malts as adjunct on the quality of craft beers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(7), e16684. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16684>
- Watawana, M. I., N. Jayawardena, S. J. Ranasinghe, and V. Y. Waisundara. (2017). Evaluation of the effect of different sweetening agents on the polyphenol contents and antioxidant and starch hydrolase inhibitory properties of kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41:e12752. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12752>.
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)

- Yan, D., Wong, Y. F., Shellie, R. A., Marriott, P. J., Whittock, S. P., & Koutoulis, A. (2019). Assessment of the phytochemical profiles of novel hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars: A potential route to beer crafting. *Food Chemistry*, 275, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.082>
- Yapo, B. M., Besson, V., Koubala, B. B., & Koffi, K. L. (2013). Adding value to cacao pod husks as a potential antioxidant-dietary fiber source. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), 38-46. <https://doi.org/10.12691/ajfn-1-3-4>
- Yuliana, N., Nurainy, F., Sari, G. W., & Widiastuti, E. L. (2023). Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. *Applied Food Research*, 3(1), 100297. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100297>
- Zapata, A.M. (2010). Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas. *Tumbaga*, 1(5), 49–60.
- Zhigue, J. C. H., Romero, E. J. M., & Balcázar, M. I. L. (2022). Vino de mucílago: costos de operación en la Finca “La Pradera” del Cantón Santa Rosa. *Polo del Conocimiento*, 7(8), 1724-1745. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i8.4483>
- Zúñiga Cerón, V., & Gandini Ayerbe, M. A. (2013). Caracterización ambiental de las vinazas de residuos de caña de azúcar resultantes de la producción de etanol. *Dyna*, 80(177), 124-131.