

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

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

“Determinación del Contenido de Polifenoles y Actividad
Antioxidante de una Bebida Láctea Elaborada a Base de
Residuos Agroindustriales de Cacao, Café y Naranja”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERAS EN ALIMENTOS

Presentado por:

Gianella Lisbeth Franco Agurto

Karen Belén Suárez Quirumbay

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2014

AGRADECIMIENTO

A mis padres por confiar en mí y permitirme culminar esta etapa de educación profesional. A mis hermanos por apoyarme en todo momento. Agradecimiento especial a mi compañera de tesis y amiga Karen Suárez. A mis grandes amigos Karina Cadena, Kevin Palma y Michelle Peralta.

Agradezco a mi directora de tesis Ing. María Fernanda Quijano y a la Dra. Patricia Manzano por brindarnos todo su apoyo en la realización de este trabajo. De igual manera quiero expresarles mi gratitud al Ing. Patricio Cáceres, Ing. Ana Barragán e Ing. Iván Choéz.

Gianella.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme salud y fuerzas; por permitirme culminar con éxito una etapa más de mi vida.

A mis padres por su sacrificio durante mis años de estudio, a mis hermanos por su apoyo incondicional, a mis amigos que han estado en todo momento y en especial a Gia por su paciencia y dedicación durante el desarrollo de esta tesis.

De igual manera quiero agradecer a nuestra Directora de tesis Ing. María Fernanda Quijano por su guía y apoyo, Dra. Patricia Manzano por su confianza brindada, al Ing. Patricio Cáceres, Ing. Anita Barragán e Ing. Iván Chóez por su colaboración y ayuda.

Karen.

DEDICATORIA

A mis padres por su amor
incondicional.

Gianella

DEDICATORIA

A mis padres:

Segundo y Piedad

A mis hermanos:

Shirley y Richard

A mis abuelitos y demás familiares

Karen.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Dr. Kleber Barcia V. Ph.D.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Ing. Ma. Fernanda Quijano
DIRECTORA DE TESIS



Ing. Patricio Cáceres C.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)


Gianella Lisbeth Franco Agurto


Karen Belén Suárez Quirumbay

RESUMEN

Ecuador es un país productor de cacao, café y naranja; que ha desarrollado un modelo de producción de elaborados y semielaborados a partir de estas materias primas. El proceso de transformación de estos productos genera cantidades significativas de residuos que provocan un impacto ambiental negativo, por lo que la industria ha centrado la atención en la utilización de estos residuos hacia la elaboración de alimentos para el consumo animal y abono orgánico. No obstante, estudios demuestran la presencia de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en estos residuos, los cuales se podrían dirigir para la elaboración de productos de interés para el consumo humano.

Con estos antecedentes, se elaboró una bebida láctea a partir de un extracto acuoso al 10% de la mezcla de la cascarilla de cacao, cascarilla de café y cáscara de naranja obtenidas por cocción. Las materias primas fueron sometidas a análisis fisicoquímicos, microbiológicos y tamizaje fitoquímico. Se realizó un diseño de mezclas de vértices extremos donde se obtuvieron diferentes formulaciones variando las proporciones de los ingredientes del extracto, los cuales se mezclaron con otros ingredientes para la formulación de las bebidas a analizar. Las bebidas fueron pasteurizadas y evaluadas por los atributos de sabor, olor, color y apariencia mediante paneles sensoriales conformados por jueces no entrenados. La selección de la mejor formulación

se llevó a cabo mediante una optimización, considerando las características sensoriales de las mejores mezclas y el contenido de polifenoles totales de cada componente del extracto acuoso, dando como resultado la fórmula que contenía 80,5:18,37:1,13% de cascarilla de cacao, cascarilla de café y cáscara de naranja respectivamente.

Finalmente, se analizaron las características fisicoquímicas y microbiológicas del producto final. Se cuantificó el contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y se obtuvo $4,99 \pm 0,34$ miligramo de ácido gálico por gramo de muestra; se determinó la actividad antioxidante empleando el método basado en la estabilidad del radical 1,1-difenil- 2-picrilhidrazil (DPPH) presentando un $80,14 \pm 0,05\%$; y para la determinación de cafeína se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a partir de una solución estándar de cafeína de 1000 ppm, se obtuvo una concentración de cafeína de 57,39 mg/L. A partir de los resultados obtenidos, se pretende generar un valor agregado a la cadena productiva agroalimentaria del país.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	3
1.1. Antecedentes y Justificación.....	3
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Hipótesis.....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo general	5
1.4.2. Objetivos específicos	5
CAPITULO 2	
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Cascarilla de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	6
2.1.1 Producción nacional de cacao.....	7

2.1.2	Composición química y valor nutricional.....	9
2.1.3	Usos.....	9
2.2.	Cascarilla de café (<i>Coffea arábica</i> L.)	10
2.2.1.	Producción nacional de café	11
2.2.2.	Composición química y valor nutricional.....	12
2.2.3.	Usos.....	12
2.3.	Cáscara de naranja (<i>Citrus x sinensis</i>)	13
2.3.1.	Producción nacional de naranja	13
2.3.2.	Composición química y valor nutricional.....	14
2.3.3.	Usos.....	15
2.4.	Radicales libres	15
2.4.1.	Fuentes de radicales libres.....	15
2.4.2.	Estrés oxidativo	16
2.5.	Actividad antioxidante	17
2.6.	Polifenoles	17
2.6.1.	Clasificación de los polifenoles.....	19
CAPITULO 3		
3.	METODOLOGÍA	21
3.1.	Caracterización de la materia prima.....	21
3.1.1.	Análisis fisicoquímico	21
3.1.2.	Tamizaje fitoquímico	22
3.1.3.	Análisis microbiológico	25

3.2.	Proceso de obtención de la bebida láctea.....	25
3.2.1.	Descripción del proceso	27
3.2.2.	Tratamiento térmico	28
3.3.	Diseño experimental	29
3.3.1.	Definición de la hipótesis.....	29
3.3.2.	Determinación de variables	30
3.3.3.	Determinación de las corridas experimentales	30
3.4.	Evaluación sensorial	31
3.4.1.	Diseño de pruebas sensoriales	33
3.4.2.	Materiales y procedimiento.....	34
3.5.	Caracterización del producto final	35
3.5.1.	Análisis fisicoquímico	35
3.5.2.	Análisis microbiológico	36
3.6.	Determinación de polifenoles y actividad antioxidante	37
3.6.1.	Contenido de polifenoles totales.....	38
3.6.2.	Porcentaje de actividad antioxidante	39
3.7.	Determinación de cafeína	40
3.8.	Balance de materia	42
CAPITULO 4		
4.	RESULTADOS Y ANALISIS.....	45
4.1.	Características de la materia prima.....	45
4.1.1.	Análisis fisicoquímico	45

4.1.2. Tamizaje fitoquímico	46
4.1.3. Análisis microbiológico	48
4.2. Validación estadística del diseño experimental	49
4.2.1. Análisis estadístico: ANOVA	49
4.2.2. Perfil sensorial del mejor tratamiento	58
4.3. Caracterización del producto final	59
4.3.1. Análisis fisicoquímico	60
4.3.2. Análisis microbiológico	62
4.4. Determinación de polifenoles y actividad antioxidante	63
4.5. Determinación de cafeína	64
CAPITULO 5	
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
5.1. Conclusiones	68
5.2. Recomendaciones	69
APENDICES	
ANEXOS	
BIBLIOGRAFÍA	

ABREVIATURAS

CCN51	Colección Castro Naranjal 51
cm	Centímetro
g	Gramo
mg	Miligramo
GAE	Equivalente de Àcido Gálico
ml	Mililitros
nm	Nanómetro
pH	Potencial de Hidrógeno
CPT	Contenido de Polifenoles Totales
%AA	Porcentaje de Actividad Antioxidante
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos

SIMBOLOGÍA

° C	Grados Celsius
CM	Varianza
F	F calculado
GL	Grados de Libertad
N	Número de Muestras
P	Valor P
SC	Suma de Cuadrados
S	Desviación estándar
%	Porcentaje
Ha	Hipótesis alterna
Ho	Hipótesis nula

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Cascarilla de cacao.	7
FIGURA 2.2 Cascarilla de café.	10
FIGURA 2.3 Cáscara de naranja.	13
FIGURA 2.4 Interacción de antioxidantes con radicales libres.	17
FIGURA 2.5 Estructura química de flavonoides.	19
FIGURA 3.1 Esquema del tamizaje fitoquímico (Miranda y Cuéllar, 2000). ..	24
FIGURA 3.2 Diagrama de proceso de obtención de la bebida láctea.	26
FIGURA 3.3 Laboratorio de Análisis Sensorial de LICNUT.	35
FIGURA 3.4 Diagrama de balance de materia.	43
FIGURA 4.1 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo sabor.	51
FIGURA 4.2 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo olor.	52
FIGURA 4.3 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo color.	53
FIGURA 4.4 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo apariencia.	55
FIGURA 4.5 Perfil sensorial de la bebida láctea.	59

FIGURA 4.6 Cromatograma de la bebida láctea.65

FIGURA 4.7 Cromatograma de la marca comercial.66

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Composición proximal de la cascarilla de cacao (% de materia cruda)	9
TABLA 2 Composición proximal de la cascarilla de café (% de materia cruda)	12
TABLA 3 Composición proximal de la cáscara de naranja.....	14
TABLA 4 Clasificación de compuestos fenólicos	20
TABLA 5 Metodología para caracterización fisicoquímica de las materias primas.....	22
TABLA 6 Protocolos empleados en el tamizaje químico del extracto acuoso de la cascarilla de cacao.....	23
TABLA 7 Metodología para caracterización microbiológica de las materias primas.....	25
TABLA 8 Corridas experimentales.....	31
TABLA 9 Muestras codificadas	34
TABLA 10 Metodología para caracterización microbiológica del producto terminado	37
TABLA 11 Composición proximal de las materias primas	46

TABLA 12 Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las materias primas	47
TABLA 13 Resultados de la caracterización microbiológica de las materias primas.....	48
TABLA 14 Respuestas del diseño experimental	50
TABLA 15 Resumen del informe de respuesta de Solver	58
TABLA 16 Composición proximal de la bebida láctea.....	60
TABLA 17 Comparación de la composición proximal de la bebida láctea y marca comercial	61
TABLA 18 Composición proximal del residuo del extracto	62
TABLA 19 Comparación de polifenoles y actividad antioxidante de la bebida láctea y marca comercial	64
TABLA 20 Resultados HPLC del estándar de cafeína	65

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha realizado una serie de mejoras continuas en relación a la calidad de los productos que ofrecen las agroindustrias, provocando un aumento en su exportación a países de Europa y América del Sur (1,2). Por ende estas industrias generan grandes cantidades de residuos, los cuales en su mayoría no son aprovechados, el uso de la semilla de cacao y café en la industria se ha enfocado principalmente en la elaboración de productos derivados que sólo utilizan el grano descascarillado como materia prima, el principal residuo que se obtiene es la cascarilla durante el proceso de tostado del grano, representando el 12% del peso en grano seco (cacao) (3). En la actualidad, se conoce que la cascarilla se la direcciona para el consumo animal o como abono orgánico, no obstante estudios realizados han demostrado que estos subproductos poseen cantidades significativas de componentes bioactivos (4,5). Es así que en este trabajo se busca dar un valor agregado a dichos residuos desarrollando una bebida láctea a base de cascarilla de cacao, cascarilla de café y cáscara de naranja.

En el presente trabajo se realizó un diseño de mezclas, a partir del cual se definieron 13 formulaciones que fueron analizadas por un panel sensorial basándose en características sensoriales (sabor, olor, color y apariencia). Con los resultados obtenidos se llevó a cabo un análisis estadístico para la

selección de las cinco mejores formulaciones para realizar un proceso de optimización, obteniéndose la mejor formulación considerando estas características y el contenido de polifenoles totales de cada componente del extracto acuoso. A partir de la formulación optimizada se elaboró la bebida láctea, a la cual se le realizaron una serie de pruebas experimentales para constatar la presencia de compuestos de interés, incluyendo la determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, la medición de la actividad antioxidante empleando un radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y la determinación de la concentración de cafeína empleando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Antecedentes y Justificación

De acuerdo a un estudio de mercado realizado por la empresa Transmar en el 2013, Ecuador es el sexto mayor productor de cacao (6) y en el sector cafetero es considerado como un gran exportador (1). Estas industrias generan cantidades significativas de residuos, las cuales en su mayoría no son aprovechados a pesar de poseer compuestos bioactivos de interés para el consumo humano (4).

El presente proyecto de tesis busca reducir el impacto ambiental generado por los desechos de las industrias de cacao, café y

naranja, mediante el desarrollo de una bebida con actividad antioxidante. Se pretende generar con esto un valor agregado a los residuos agroindustriales (cascarilla de cacao, cascarilla de café y cáscara de naranja)

1.2. Planteamiento del problema

Ecuador es un país productor de cacao, café y naranja, lo cual implica que la generación de residuos sea considerable. Por lo que se busca darle un valor agregado a la cadena de producción desarrollando un producto para el consumo humano a partir de los residuos de dichas agroindustrias, que logre cumplir altos estándares de calidad y sea agradable al consumidor.

1.3. Hipótesis

La mezcla de residuos agroindustriales de cacao (*Theobroma cacao* L.), café (*Coffea arábica* L.) y naranja (*Citrus x sinensis*) se pueden utilizar como materia prima para la elaboración de una bebida láctea con polifenoles y actividad antioxidante que posean características aceptables para el consumidor.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar una bebida láctea que incluya como materia prima los desechos agroindustriales del café, cacao y naranja, de buena calidad sensorial y aceptabilidad.

1.4.2. Objetivos específicos

- Realizar un diseño experimental de mezclas de vértices extremos y evaluar las características sensoriales de las formulaciones obtenidas.
- Determinar la formulación final que posea las mejores características sensoriales y mayor contenido de polifenoles mediante un proceso de optimización.
- Caracterizar la bebida láctea mediante análisis fisicoquímico y microbiológico.
- Determinar la actividad antioxidante de la bebida láctea por medio de espectrofotometría ultravioleta-visible.
- Cuantificar la concentración de cafeína en la bebida láctea mediante cromatografía líquida de alta resolución.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.)

El árbol de cacao crece en las zonas tropicales, consta de flores y pétalos alargados, su fruto es leñoso y se lo conoce como mazorca (2), consta de 20 – 50 semillas incrustadas en una vaina que a su vez están rodeadas por una pulpa dulce de color blanco conocida como mucílago (7). Las semillas se encuentran cubiertas por una delgada capa denominada cascarilla (7), la que se considera como un residuo generado por la industria procesadora de cacao y chocolate (8). Figura 2.1



FIGURA 2.1 Cascarilla de cacao.

2.1.1 Producción nacional de cacao

En el Ecuador se producen en promedio 182794 toneladas métricas de cacao (*Theobroma cacao* L.) según datos recopilados por PROECUADOR en el 2013, de los cuales el 93,18% es exportado a países como México, Malasia, Alemania y Holanda; y sólo el 6,8% es utilizado como materia prima para la elaboración de producto de consumo nacional (2).

Las principales regiones productoras de cacao en el Ecuador son la Costa y la Amazonía, en especial las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el Ecuador se desarrollan 2 tipos de cacao (2):

- Cacao fino de aroma, denominado también Nacional se caracteriza por su color amarillo, debido a su aroma y sabor único, es exportado a nivel mundial para la elaboración de productos gourmet.
- Cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal) posee color rojo. Se lo destina para la producción de semielaborados de cacao (2).

Los principales productos de exportación son: cacao en grano, pasta de cacao, polvo de cacao, torta de cacao, manteca de cacao, chocolate, cáscaras, y demás residuos de cacao (2).

Entre los residuos generados en la industrialización del cacao encontramos a la cáscara de la mazorca, mucílago y cascarilla. La cascarilla del grano del cacao generado en los procesos agroindustriales representa el 12% del peso en grano seco (3).

2.1.2 Composición química y valor nutricional

La composición química de la cascarilla de cacao es compleja debido a los macronutrientes y micronutrientes que posee. En la tabla 1 se puede apreciar el alto contenido de fibra insoluble, fibra soluble y proteína cruda que poseen estos residuos (9). Además, contiene compuestos bioactivos como los polifenoles que se caracterizan por su actividad antioxidante (4).

Tabla 1
Composición proximal de la cascarilla de cacao (% de materia cruda)

Parámetros	
Humedad. %	3,73 ± 0,46
Cenizas. %	5,96 ± 0,26
Grasa cruda. %	6,87 ± 0,52
Proteína Cruda. %	16,93 ± 0,59
Fibra dietética soluble. %	11,08 ± 0,05
Fibra dietética insoluble. %	48,94 ± 1,21
Polifenoles, mg GAE/g	2,56

Fuente: (Nsor-Atindana *et al.*, 2012; Bruna *et al.*, 2009)

2.1.3 Usos

En la actualidad el uso de la cascarilla de cacao está enfocado en la determinación de sus compuestos bioactivos

a partir de los cuales se han desarrollado alimentos funcionales para el consumo humano como la elaboración de una infusión aromática a partir de la cascarilla de cacao de fino aroma (10), la extracción de pectinas a partir de la cascarilla del grano de cacao (11); y, la formulación de dietas experimentales para consumo animal elaborados a diferentes concentraciones de este residuo (3).

2.2. Cascarilla de café (*Coffea arábica* L.)

Los árboles de café alcanzan una altura mayor a doce metros, sus hojas tienen forma ovalada, sus frutos son pequeños y de color rojizo, dentro de la cuales consta de dos semillas, estas a su vez se encuentran recubiertas por una envoltura cartilaginosa de color amarillento de aproximadamente 100 micrómetros de espesor y que corresponde al endocarpio (pergamino) denominado cascarilla de café (12). Figura 2.2.



FIGURA 2.2 Cascarilla de café.

2.2.1. Producción nacional de café

En el Ecuador se producen tres variedades de café: Arábigo Lavado, Arábigo Natural, Robusta. Nuestro país se encuentra entre los principales productores y exportadores de café, es uno de los más requeridos por Europa por sus características organolépticas únicas que están relacionadas a su ubicación geográfica (1).

De acuerdo a la diversidad de entornos que posee el Ecuador, el café se lo puede cultivar en diferentes regiones. Entre los meses de marzo a octubre se produce café arábigo mientras que la variedad robusta se da desde febrero a noviembre (1).

De acuerdo a un estudio realizado en el 2012 por el Consejo Cafetalero Nacional Cofenac, la producción nacional fue de 650000 sacos de 60 kilos, siendo 400000 sacos destinados para exportación mientras que solo 150000 fueron para consumo interno (1).

2.2.2. Composición química y valor nutricional

Se puede resaltar en relación al carácter nutricional de la cascarilla de café, alto porcentaje de fibra cruda, el cual a pesar de no cumplir funciones metabólicas aporta en los procesos fisiológicos como regulador del tránsito gastrointestinal (tabla 2).

Tabla 2
Composición proximal de la cascarilla de café (% de materia cruda)

Parámetro	%
Materia seca	88,4 ± 3,2
Proteína cruda	9,3 ± 1,0
Fibra cruda	37,2 ± 7,6
Cenizas	6,5 ± 2,1

Fuente: (Bouafou *et al.*, 2011)

2.2.3. Usos

La cascarilla de café es un subproducto que se lo emplea principalmente para la alimentación animal (ganado, ovejas y cerdos) como constituyente de balanceados (5), utilizada también como fuentes potenciales de antocianinas para aplicaciones como colorantes de alimentos naturales (13); y, como sustrato en cultivo para hortalizas (14).

2.3. Cáscara de naranja (*Citrus x sinensis*)

El naranjo es un árbol robusto puede llegar a medir hasta 20 metros de altura, tiene un tronco grueso y una copa densa. Sus frutos son cítricos, redondeados de color naranja. La capa externa del fruto denominada cáscara (figura 2.3) está compuesto por el flavedo y el albedo, posee una estructura carnosa, porosa y áspera con un aroma intenso. La pulpa está formada por hollejos que contienen jugo, el cual es rico en vitamina C, aceites esenciales y flavonoides (15).



FIGURA 2.3 Cáscara de naranja.

2.3.1. Producción nacional de naranja

En el Ecuador la producción de naranja especialmente la variedad Común y Valenciana están destinadas principalmente para el consumo como fruto fresco (15).

Según datos proporcionados por el INEC en el año 2012 hubo una producción nacional de 48380 toneladas métricas de naranja aumentando un 24,34% en relación al año anterior 2011 (16).

2.3.2. Composición química y valor nutricional

La cáscara de naranja es un residuo no aprovechado a pesar de poseer características nutricionales beneficiosas como el contenido de carbohidratos y fibra dietaria presentando un 25% y 10,6%, respectivamente (tabla 3), posee polifenoles y propiedades antioxidantes que resultan de interés para la industria alimentaria (17).

Tabla 3
Composición proximal de la cáscara de naranja

Parámetro	%
Agua	72,50
Carbohidratos	25,00
Proteínas	1,50
Fibra dietaria	10,6
Cenizas	0,80

Fuente: (USDA, 2007. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20)

2.3.3. Usos

La cáscara de naranja se la emplea principalmente para la obtención de aceites esenciales (18), a su vez para extracción de pectina (19) y fuente de compuestos fenólicos (20).

2.4. Radicales libres

Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (EROS) son metabolitos secundarios de los procesos oxidativos normales de las células, estos son extremadamente reactivos e inestables debido a que poseen electrones desapareados, por lo cual capturan los átomos de hidrógeno de una estructura química generando la formación de una molécula inestable y un efecto de reacción en cadena (21).

2.4.1. Fuentes de radicales libres

La generación de los radicales libres se asocia a procesos biológicos o a las situaciones adversas que afectan al cuerpo humano (22).

Fuentes endógenas: Los radicales libres es el resultado de procesos aeróbicos a nivel celular como la respiración mitocondrial y metabolismo de alimentos (22).

Fuentes exógenas: se asocia a factores ambientales como el ejercicio, contaminación, tabaco, radiación, medicamentos, aditivos químicos en alimentos procesados y pesticidas (22).

2.4.2. Estrés oxidativo

Se considera como un desequilibrio entre la generación de radicales libres y los mecanismo de defensa antioxidantes. En condiciones normales nuestro organismo aporta con cierta cantidad de antioxidantes para combatir los radicales libres, no obstante si la producción de radicales libres es excesiva y las defensas antioxidantes están comprometidas, los radicales libres logran afectar la estructura de las macromoléculas, tales como lípidos, carbohidratos, proteína, ADN y el funcionamiento celular. El estrés oxidativo se relaciona con la generación de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y envejecimiento celular (23).

2.5. Actividad antioxidante

Para combatir los radicales libres, nuestro organismo desarrolla como defensa un sistema basado en agentes antioxidantes como las vitaminas C, A, E, polifenoles, carotenoides, minerales tales como zinc, selenio y magnesio que se obtienen a partir de la dieta. En la figura 2.4 se puede observar el mecanismo de acción y estructura de una molécula antioxidante, la cual le permite ceder un electrón, oxidarse y transformarse en un radical libre débil no tóxico (22).

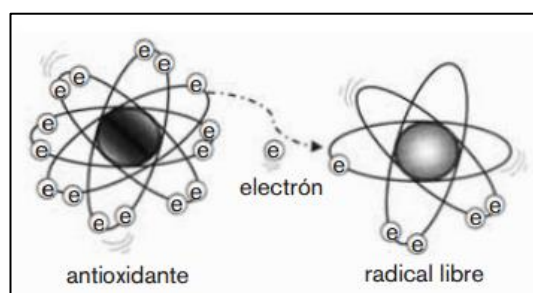


FIGURA 2.4 Interacción de antioxidantes con radicales libres.
(Fuente: Velásquez M, 2004).

2.6. Polifenoles

Los compuestos bioactivos provenientes de las plantas como los compuestos polifenólicos han ganado un interés sustancial en los recientes años debido a sus funciones y valor nutricional,

incluyendo actividades antioxidantes, antimicrobianas, antimutagénicos y antitumorales (9).

La actividad antioxidante de los polifenoles se centra en la acción de los grupos fenólicos, los cuales poseen la capacidad de actuar como donadores de electrones, reductores y formadores de puentes de hidrógeno. Estos compuestos pueden desempeñarse como antioxidantes primarios antirradicalarios o como sustancias reductoras, agentes sinérgicos o como antagonista de metales de transición (24). Al referirse a la propiedad quelante, se debe resaltar que secuestran el hierro y cobre, los cuales son catalizadores de la formación de radicales libres (25).

Los flavonoides constituyen la fuente más importante de polifenoles de las plantas (pigmentos naturales), caracterizados debido a su actividad antioxidante atribuida a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (26), como se observa en la figura 2.5. A su vez proporciona efectos antiinflamatorios, antivirales y papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (27). Los flavonoides son metabolizados parcialmente a nivel del intestino delgado, mientras que otra porción se dirige al colon donde las enzimas segregadas por la flora

bacteriana ayuda a que se metabolice completamente estos grupos polifenólicos y puedan ser absorbidos por el organismo (24).

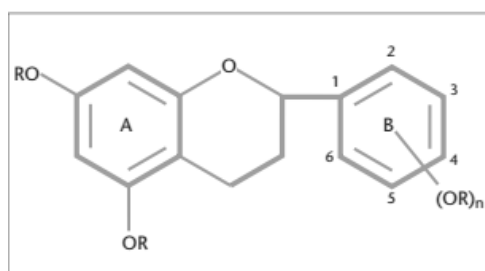


FIGURA 2.5 Estructura química de flavonoides.

(Fuente: Paredes F, 2005).

Estudios in vitro han concluido que los polifenoles naturales poseen una mayor actividad antioxidante que las vitaminas E y C. En el grupo de los ácidos fenólicos encontramos al ácido gálico, el cual se emplea como estándar en la medición de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, debido a su adecuada estabilidad, alta solubilidad en agua y bajo costo (25).

2.6.1. Clasificación de los polifenoles

En la tabla 4 se presenta la clasificación de los compuestos fenólicos y sus propiedades biológicas asignadas (28).

Tabla 4
Clasificación de compuestos fenólicos

Grupo	Subgrupo	Propiedades
Fenoles y ácidos fenólicos	Fenoles sencillos, estilbenos, ácidos fenólicos	Antioxidante frente a desordenes cardiovasculares, antiinflamatorias y anticancerígenas.
Cumarinas	Sencillas, C-prednizada, dicumarinas	Antiinflamatorios, antiespasmódicos, y anticoagulantes.
Lignanós	Simples, ciclolignanós, flavanolignanós, lignina	Efecto antimitótico, antimicótico, antivírico, laxante hepatoprotector, antirradicales libres, diurético, antiinflamatorio.
Flavonoides y compuestos relacionados	Flavonoles, flavanololes, flavonas, flavanonas, chalconas, isoflavonoides, antocianidinas, catequinas, leucoantocianidinas	Actividad antioxidante
Taninos	Taninos hidrolizables, taninos condensados	Agentes quelantes
Quinonas y antracénósidos	Benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, antraciclina, oxantranas, antranas, dihidroantranoles	Antitumorigénico, antisépticas, laxantes, antibióticas.

Fuente: (Murcia *et al.*, 2003)

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

La experimentación se realizó en el laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus “Gustavo Galindo” de la ciudad de Guayaquil, Ecuador.

3.1. Caracterización de la materia prima

3.1.1. Análisis fisicoquímico

Para evaluar la calidad de las materias primas se realizó un análisis fisicoquímico, que comprende una serie de pruebas, incluyendo determinación de humedad y cenizas.

Las cenizas totales se denominan como todo resto inorgánico que durante el proceso de combustión no se combina con el oxígeno, es decir queda remanente después de la ignición. Las cenizas insolubles son el resultado de someter las cenizas totales a ebullición con ácido clorhídrico diluido y las cenizas solubles en agua están constituidas por las cenizas totales que se disuelven en agua (29). Las metodologías utilizadas en la caracterización fisicoquímicas se resumen en la tabla 5.

Tabla 5
Metodología para caracterización fisicoquímica de las materias primas

Parámetro	Método	Protocolo
Humedad	Gravimétrico	CBE-PROT-BP030
Cenizas Totales	Gravimétrico	CBE-PROT-BP023
Cenizas solubles en agua	Gravimétrico	CBE-PROT-BP024
Cenizas insoluble en ácido	Gravimétrico	CBE-PROT-BP025

3.1.2. Tamizaje fitoquímico

La identificación de los principales grupos químicos se desarrolló según metodología descrita por Miranda y Cuellar

(2000) (30), el procedimiento y protocolos se presentan en la figura 3.1 y tabla 6, respectivamente.

Tabla 6
Protocolos empleados en el tamizaje químico del extracto acuoso de la cascarilla de cacao

Grupos químicos	Método	Protocolo
Alcaloides	Colorimétrico	CBE-PROT-BP006
Taninos	Colorimétrico	CBE-PROT-BP006
Mucilago	Colorimétrico	CBE-PROT-BP006
Flavonoides	Colorimétrico	CBE-PROT-BP006
Saponinas	Colorimétrico	CBE-PROT-BP006
Azúcares	Colorimétrico	CBE-PROT-BP006

Este análisis se inicia con el pesaje de las muestras 30 a 50 g de las tres muestras (cascarilla de cacao, cascarilla de café y cáscara de naranja), posteriormente se macera con tres veces el peso de la muestra con agua destilada por 48 horas. Se procede a filtrar para la obtención del extracto acuoso, con el cual se realizan los microensayos.

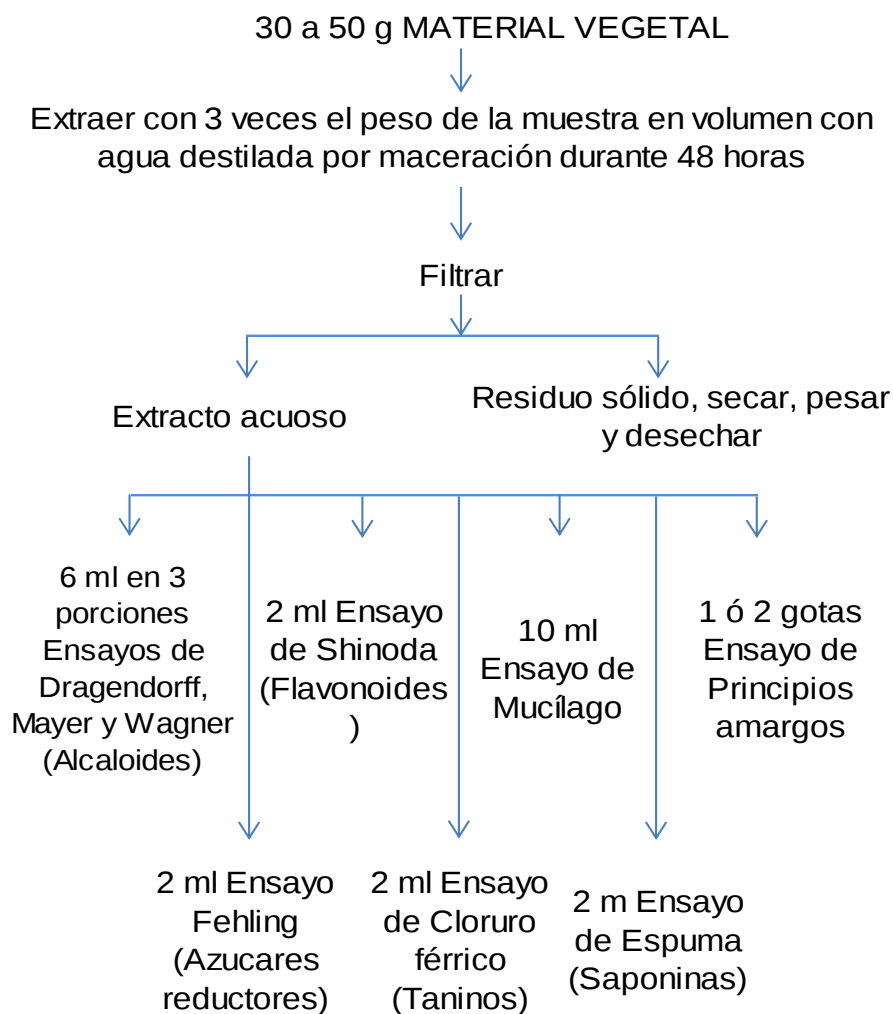


FIGURA 3.1 Esquema del tamizaje fitoquímico (Miranda y Cuéllar, 2000).

3.1.3. Análisis microbiológico

Se aplicó el método de ensayo NTE INEN 1529-6:90 para determinación de microorganismos coliformes totales empleando la técnica del número más probable, para ello se tuvo como marco normativo la norma NTE INEN 1123:2006 referente a café tostado y molido (tabla 7). El análisis fue realizado por el Programa de soporte de servicios de alimentos de la ESPOL (Anexo A y B)

Tabla 7

Metodología para caracterización microbiológica de las materias primas

Parámetro	Método	Protocolo
Coliformes Totales	Microbiológico	NTE INEN 1123:2006

3.2. Proceso de obtención de la bebida láctea

En la figura 3.2 se presenta el proceso para elaboración de la bebida láctea a base de las cascarillas de cacao, café y cáscara de naranja.

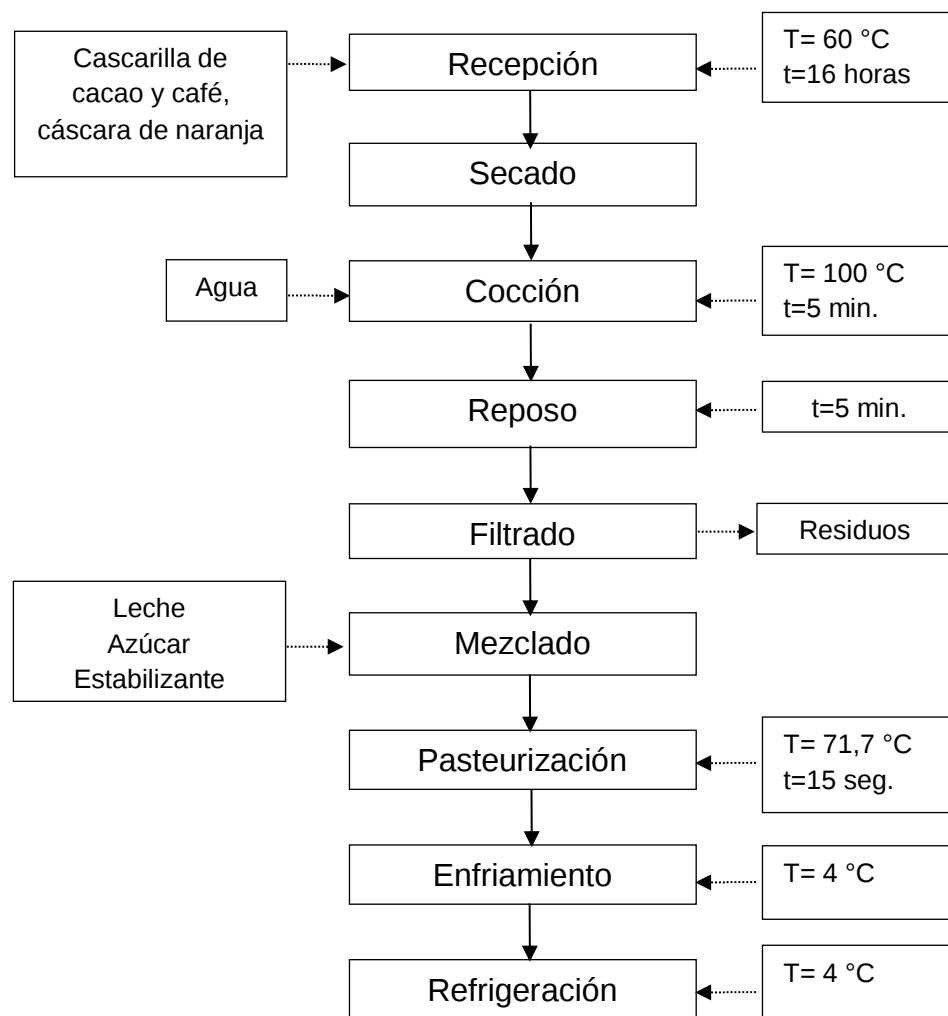


FIGURA 3.2 Diagrama de proceso de obtención de la bebida láctea.

3.2.1. Descripción del proceso

Recepción de la materia prima

En esta etapa las materias primas fueron sometidas a análisis sensoriales para aseguramiento de la calidad.

Secado

Las cascarillas de cacao, café y cáscara de naranja se sometieron a un proceso de secado en estufa marca Memmert, con cámara de flujo de aire a una temperatura de 60°C durante 16 horas para reducir carga microbiana y prolongar su conservación.

Cocción

Se obtuvo el extracto acuoso al 10% de la mezcla de las cascarillas de cacao, café y cáscara de naranja obtenida mediante cocción a 100°C en una hornilla eléctrica marca HACEB durante 5 minutos.

Reposo

El extracto acuoso obtenido en la etapa de cocción se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Filtrado

Se procedió a filtrar para obtener el extracto acuoso libre de partículas.

Mezclado

Se adicionó la leche, azúcar, estabilizantes y conservantes, se agitó hasta obtener una solución homogénea.

Pasteurización

Se llevó a cabo a 71,7°C, por 15 segundos

Enfriamiento

Se dejó enfriar hasta alcanzar 4°C aproximadamente.

Refrigeración

La refrigeración debe ser de 4°C para su conservación.

3.2.2. Tratamiento térmico

Los procesos térmicos se emplean para la reducción de la carga microbiana en los alimentos, permitiendo el aseguramiento de la calidad del mismo. Los parámetros

térmicos son definidos en función del microorganismo más termorresistente. De acuerdo a Holsinger, Rajkowski, y Stabel, en productos lácteos *Coxiella burnetti* es más termorresistente que *M. tuberculosis* (31), incluso sobreviven luego de una pasteurización a 61,7 ° C durante 30 min. Debido a esto, posteriormente Enright *et al.* planteó que la pasteurización debe realizarse alrededor de 62,7 °C por 30 minutos o una pasteurización rápida (HTST) alcanzando una temperatura de 71,7°C durante 15 segundos lo que proporciona un margen de seguridad aceptable (32).

3.3. Diseño experimental

3.3.1. Definición de la hipótesis

La hipótesis establecida en función del diseño de experimentos se planteó de la siguiente manera:

Ho: Las muestras proporcionadas a los jueces no presentan diferencia significativas entre sí en relación a cada una de las características organolépticas.

Ha: Las muestras proporcionadas a los jueces presentan diferencia significativas entre sí en relación a cada una de las características organolépticas.

3.3.2. Determinación de variables

El diseño experimental realizado en el proceso de elaboración de la bebida láctea tuvo como objetivo encontrar la mejor formulación de acuerdo a varios parámetros que se señalan posteriormente. Se definieron tres variables independientes, porcentaje de cascarilla de cacao, cascarilla de café y cáscara de naranja. Las variables dependientes fueron: sabor, olor, color y apariencia.

3.3.3. Determinación de las corridas experimentales

Se aplicó un diseño de mezclas de vértices extremos, y mediante el programa Statgraphics Centurion Version 15 se obtuvieron 13 formulaciones variando la proporción de los componentes del extracto como se puede apreciar en la tabla 8.

Tabla 8

**Corridas experimentales.
Mezcla de componentes del extracto.**

Corridas	Cacao (%)	Café (%)	Naranja (%)
1	100,00	0	0
2	75,50	24,50	0,00
3	98,50	0,00	1,50
4	74,00	24,50	1,50
5	93,50	6,13	0,38
6	81,25	18,38	0,38
7	92,75	6,13	1,13
8	80,50	18,38	1,13
9	87,75	12,25	0,00
10	99,25	0,00	0,75
11	74,75	24,50	0,75
12	86,25	12,25	1,50
13	87,00	12,25	0,75

3.4. Evaluación sensorial

Mediante una evaluación sensorial se pueden analizar las características organolépticas de un alimento, las cuales resultan de gran importancia cuando se desea elaborar un producto nuevo (33).

SABOR

El sabor implica la combinación de tres propiedades: el olor, aroma y gusto. Por lo que, su medición es más compleja. Estas

características por separado no provocan la misma sensación que en conjunto, debido a que se centran en una sola característica del alimento. El sabor es lo que permite disfrutar y diferenciar un alimento de otro (34).

OLOR

Los objetos emiten sustancias volátiles que son percibidas por el olfato, esta sensación involucra tanto la impresión que producen estas sustancias como lo que son capaz de producirlo. Esta propiedad es único para cada alimento (34).

COLOR

El color es la percepción de la luz absorbida y reflejada sobre la retina (34). Es de interés para la industria alimentaria, ya que permite determinar ciertas anomalías en los productos y puede proporcionar mucha información acerca de su composición.

Muchas veces el color se lo supone como índice de calidad de un alimento, debido a que un cambio de color se lo considera proceso de deterioro (33).

APARIENCIA

La visión es el medio por el cual se puede determinar la apariencia de un objeto, es el primer contacto que tiene el consumidor con el producto, y está relacionado básicamente con la forma que este posea. El color también influye en la calificación de este atributo (33). Es por ello, que resulta de gran importancia analizar esta característica a las formulaciones de la bebida láctea.

3.4.1. Diseño de pruebas sensoriales

A partir de las formulaciones obtenidas del diseño experimental se realizaron las evaluaciones sensoriales, mediante el software MINITAB 16, se llevaron a cabo comparaciones de los resultados de las diferentes formulaciones y se utilizó el Método de Tukey para observar las desigualdades de los posibles pares de medias que se pueden dar, con un nivel de confianza del 95%. Las muestras fueron codificadas como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9
Muestras codificadas

Muestra	Código	Muestra	Código
1	5399	8	8700
2	1057	9	4507
3	2755	10	1388
4	1002	11	8261
5	6461	12	9512
6	5089	13	3173
7	9070	R	Estándar

3.4.2. Materiales y procedimiento

Las evaluaciones sensoriales se llevaron a cabo en el laboratorio de Análisis Sensorial de Licenciatura en Nutrición (LICNUT) como se muestra en la figura 3.3, para ello se realizó una prueba de comparaciones múltiples, en la cual se analizaron 13 muestras, comparándolas contra un estándar, marcado con “R”, que consistió en una bebida de marca comercial, donde se evaluaron los atributos de sabor, olor, color y apariencia (34). Los jueces no entrenados dieron sus respuestas de acuerdo a las fichas sensoriales que se encuentran en el Anexo C. Se realizaron tres sesiones para evitar cansancio por parte de los jueces.



FIGURA 3.3 Laboratorio de Análisis Sensorial de LICNUT.

3.5. Caracterización del producto final

3.5.1. Análisis fisicoquímico

Los análisis fisicoquímicos realizados para caracterizar el producto final se detallan a continuación:

- Humedad: Se realizó en la estufa marca Memmert mediante el método gravimétrico CBE-PROT-BP030.
- Proteína: Se determinó proteínas empleando el método de Biuret mediante espectrofotometría de acuerdo al protocolo CBE-PROT-BP047.
- Grasas: Se utilizó el método Soxhlet mediante la técnica descrita en el protocolo CBE-PROT-BP027
- Fibra cruda: Se empleó el ácido sulfúrico al 0.255 N y hidróxido de sodio al 0.313 N mediante el protocolo CBE-PROT-BP026

- Polifenoles: se realizó por espectrofotometría de acuerdo al protocolo CBE-PROT-BP046.
- Grados Brix: Se utilizó un refractómetro y se realizó las mediciones por triplicado.
- Actividad antioxidante: Se llevó a cabo mediante el método de espectrofotometría descrito en el protocolo CBE-PROT-BP044.
- pH: Se utilizó un potenciómetro.
- Densidad: Se evaluó mediante el método del picnómetro.

3.5.2. Análisis microbiológico

El producto fue analizado bajo la norma NTE INEN 2564:2011 referente a bebidas lácteas. Para el recuento de *E. coli* y coliformes totales se realizaron tres réplicas y se utilizaron placas 3M Petrifilm. Se codificaron las placas Petrifilm a utilizar; en la cabina de flujo laminar horizontal ya esterilizada, se procedió a realizar 3 diluciones (1×10^1 , 1×10^2 y 1×10^3) para posteriormente con una pipeta en posición perpendicular a la placa Petrifilm colocar uniformemente 1ml. de muestra sobre la lámina del film inferior y se dejó caer el film superior con cuidado así se evita introducir burbujas de aire. Con un diseminador se ejerció presión sobre la placa

Petrifilm para proporcionar uniformidad. Posteriormente se incubó durante 48 horas.

Para los criterios microbiológicos de aerobios mesófilos y *Listeria monocytogenes* se emplearon las técnicas señalados en la tabla 10. Los análisis fueron realizados por el Programa de soporte de servicios de alimentos de la ESPOL (Anexo E).

Tabla 10
Metodología para caracterización microbiológica del producto terminado

Parámetro	Método	Protocolo
Aerobios mesófilos	Microbiológico	Compact dry “Nissui” TC
<i>Listeria monocytogenes</i>	Microbiológico	AOAC RI 041101

3.6. Determinación de polifenoles y actividad antioxidante

A partir del producto final se realizó un estudio del contenido de polifenoles y actividad antioxidante.

3.6.1. Contenido de polifenoles totales

La cuantificación del contenido de polifenoles totales (CPT) se determinó utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu, protocolo CBE-PROT-BP046. Los polifenoles fueron expresados como equivalente de ácido gálico (GAE) usando una curva de calibración (Apéndice A), el rango de calibración de la curva fue de 0 – 0,1 mg/ml con $R^2=0,9869$. Los resultados se expresan como miligramo de ácido gálico/gramo de muestra.

La metodología aplicada fue la siguiente:

1. En un recipiente ámbar se colocaron 250 μ l de muestra.
2. Se añadieron 375 μ l del reactivo Folin-Ciocalteu; y se dejó reposar por 5 minutos.
3. Luego se le adicionó 375 μ l de Carbonato de sodio al 20%.
4. Se mezclaron bien las mezclas en un agitador vórtex; y se dejaron incubar por 90 minutos a temperatura ambiente.
5. Las muestras que presentaban una coloración azul intensa fueron diluidas (1:50) en agua grado HPLC.
6. Finalmente, se tomaron 100 μ l de las diluciones y fueron colocadas en una microplaca de 96 pocillos, las muestras

fueron medidas espectrofotométricamente a 765 nm. (Espectrofotómetro ultravioleta-visible marca SynergyHT BioTek).

3.6.2. Porcentaje de actividad antioxidante

La determinación del porcentaje de actividad antioxidante (%AA) fue adaptado a partir del método propuesto por McCue y Shetty (2008). Se basa en la estabilidad del 1,1-difenil- 2-picrilhidrazil (DPPH), el cual es un radical libre al poseer un electrón desapareado, lo que le proporciona una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción en solución etanólica, centrada alrededor de 517 nm. Cuando el radical DPPH reacciona con un compuesto antioxidante; es decir, una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno u otra especie radical (R.) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la pérdida consecuente del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (35). El procedimiento se describe a continuación:

1. Se realizó una solución del radical DPPH al 0,1 mM en etanol. Se tomaron 800 µl de la solución etanólica de DPPH y se mezclaron con 200 µl de la muestra o etanol

(control), se agitó fuertemente y se dejó incubar durante de 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz.

2. Luego las muestras fueron centrifugadas (Thermo Scientific) a 9500 rpm por un lapso de 10 minutos.
3. Se tomaron 100 μ l del sobrenadante y se lo colocó en una microplaca de 96 pocillos, para luego medir la absorbancia de cada muestra mediante un Espectrofotómetro marca SynergyHT BioTek con una longitud de onda de 517 nm.
4. El porcentaje de captación de los radicales libres se calculó con la siguiente ecuación [2] (35):

$$\%AA \text{ con DPPH} = \frac{(Abs_c - Abs_m)}{Abs_c} \times 100 \quad [2]$$

Donde, Abs_c es la Absorbancia del control y Abs_m , la Absorbancia de la muestra.

3.7. Determinación de cafeína

La cafeína es un alcaloide de fácil absorción, se metaboliza en el hígado y es excretada por medio de la orina, produce un aumento

en el estado de alerta, disminuye el agotamiento físico y mental, estimula el sistema nervioso central, muscular, respiratorio y cardiovascular por lo cual la FDA (Food and Drug Administration) ha recomendado que la ingesta diaria permisible sea de 300 mg en adultos sanos (36).

Debido a las diferentes alteraciones que puede producir el consumo de este compuesto en el organismo, es importante cuantificarla en los productos alimenticios. Uno de los métodos más confiables para su determinación es la Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) o denominado también High performance liquid chromatography (HPLC, por sus siglas en inglés), el cual se basa en la separación de componentes de una mezcla para su identificación.

Los procedimientos utilizados para la determinación de cafeína fueron adaptados a partir de la metodología descrita por Amaro. *et al.* (2008). Se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) marca Perkin Elmer series 200, equipado con detector UV-VIS, columna C18 de 250x4.20mm 5 µm. Se utilizó la mezcla de solventes grado HPLC metanol-agua (40:60) como fase móvil, con un flujo de 1ml/min, longitud de onda 254nm y 5 minutos

de tiempo de corrida. El volumen de inyección fue de 10 μ L para las muestras y el estándar (37).

Se realizó una curva de calibración para la cual se prepararon varias concentraciones (800, 600, 400, 200, 100, 50 y 25 ppm) a partir de una solución estándar de cafeína de 1000 ppm (Apéndice C). Cada una de las diluciones preparadas fueron corridas en el cromatógrafo HPLC con las condiciones descritas en el párrafo anterior, para luego determinar el área bajo la curva de cada una de las diluciones.

Para la extracción de la cafeína se realizó una dilución en metanol (50:50) de las muestras, asistida por ultrasonido por un tiempo de 30 minutos, esto ayuda al aislamiento de compuestos bioactivos.

3.8. Balance de materia

En la figura 3.4 se presenta el balance de materia para elaboración de la bebida láctea a base de las cascarillas de cacao (A), café (B) y cáscara de naranja (C).

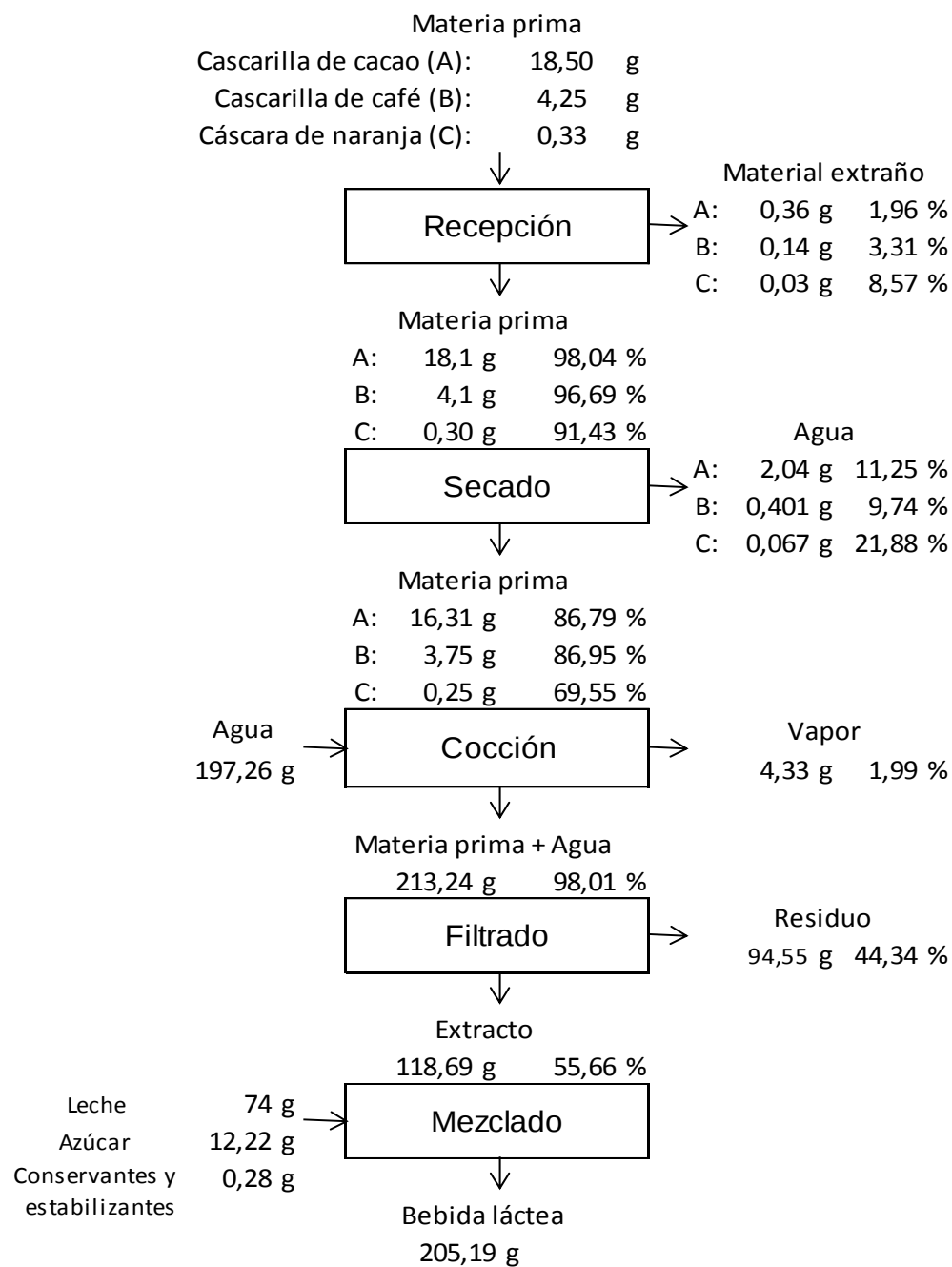


FIGURA 3.4 Diagrama de balance de materia.

Mediante el balance de materia, se obtuvo un 67% de rendimiento total, específicamente durante el proceso de filtrado se presentó el mayor porcentaje de pérdida, es decir el retiro de las cascarillas de cacao, café y cáscara de naranja.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y ANALISIS

4.1. Características de la materia prima

4.1.1. Análisis fisicoquímico

En la tabla 11 se presentan los resultados de la composición proximal de las materias primas, se observó que los principales parámetros fisicoquímicos analizados estuvieron dentro de los parámetros permitidos de acuerdo a la norma NTE INEN 1123:2006: Café tostado y molido. Al comparar el porcentaje de humedad de la cascarilla de café se obtuvo una cifra superior al rango permitido que es 5%, para reducir este factor la muestra fue sometida a un proceso de secado.

Al referirse a cenizas totales el límite máximo fue del 5% considerado dentro de los rangos fisicoquímicos definidos. Aplicando la NTE INEN 2392:2013. Hierbas aromáticas. Los requisitos en relación al porcentaje de cenizas insolubles en ácido el rango permisible es 2%, las muestras de cascarilla de cacao y café cumplieron con el parámetro especificado.

Tabla 11

Composición proximal de las materias primas

Parámetro	A (%)	B (%)	C (%)
Humedad	4,12±0,35	10,69±0,22	53,67±0,56
Cenizas Totales	6,71±0,85	6,31±0,34	1,34±0,85
Cenizas solubles en agua	3,02±0,27	4,21±0,50	0,62±0,10
Cenizas insoluble en ácido	1,17±0,09	1,47±0,38	0,49±0,36

A = Cascarilla de cacao, B = Cascarilla de café, C = Cáscara de naranja.

4.1.2. Tamizaje fitoquímico

Como se observa en la tabla 12, los resultados del tamizaje fitoquímico muestran que las materias primas presentan alcaloides (cafeína y/o teobromina), flavonoides y taninos, los cuales resultan de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes.

Tabla 12
Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las materias primas

Grupos químicos	Prueba	Resultado		
		A	B	C
Alcaloides	Dragendorff	(+)	(+)	(+)
	Mayer	(+)	(+)	(+)
	Wagner	(+)	(+)	(+)
Taninos	Cloruro Férrico	Vi	Vi	Vi
Mucílagos	Mucílago	(-)	(-)	(-)
Principios amargos	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo
Saponinas	Espuma	(-)	(-)	(-)
Azúcares reductores	Fehling	(-)	(-)	(+)
Flavonoides	Shinoda	(+)	(+)	(+)

A = Cascarilla de cacao; B = Cascarilla de café; C = Cáscara de naranja; Vi = Verde intenso; (-) = Negativo; (+) = Positivo

Además, se realizó la cuantificación del contenido de polifenoles totales de las materias primas mediante el método del Folin-Ciocalteu expuesto en el capítulo anterior. Se obtuvo como resultado que la cascarilla de cacao contenía $4,55 \pm 0,43$ mg GAE/g muestra, la cascarilla de café $6,63 \pm 0,80$ mg GAE/g muestra y la cáscara de naranja $27,8 \pm 0,64$ mg GAE/g muestra, datos que se aproximan a los de la bibliografía.

4.1.3. Análisis microbiológico

En la tabla 13 se presentan los resultados del análisis microbiológico, los cuales no cumplen con la norma NTE INEN 1123:2006 siendo el límite máximo 3,0. Se procedió a aplicar un proceso de secado térmico previamente especificado en el diagrama de proceso de obtención de la bebida láctea.

Para el análisis de la cáscara de naranja se empleó el Kit de *E. coli* y coliformes totales, reportando un resultado negativo en ambos casos.

Tabla 13
Resultados de la caracterización microbiológica de las
materias primas

Parámetro	Método	Resultado (NMP/g)		
		A	B	C
Coliformes Totales	Microbiológico	$1,5 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$	Negativo

A = Cascarilla de cacao, B = Cascarilla de café, C =
Cáscara de naranja

4.2. Validación estadística del diseño experimental

Las características organolépticas son de gran importancia en el desarrollo de un producto alimenticio, debido a que permite determinar la calidad sensorial del alimento. Es por ello que, mediante la evaluación sensorial se analizaron estadísticamente las formulaciones obtenidas en el diseño de mezclas mediante un análisis ANOVA y la prueba de Tukey.

4.2.1. Análisis estadístico: ANOVA

Mediante el software MINITAB 16, se analizaron estadísticamente cada uno de los atributos sensoriales: sabor, olor, color; apariencia; se aplicó el análisis ANOVA y la prueba de Tukey, con un nivel de confianza del 95%. Los resultados se presentan en la tabla 14.

Tabla 14.
Respuestas del diseño experimental

Corridas	Atributos Sensoriales			
	Sabor	Olor	Color	Apariencia
1	6,03 ± 1,52 ^c	6,73 ± 1,44 ^a	6,77 ± 1,41 ^b	6,97 ± 1,25 ^c
2	4,90 ± 2,07 ^a	6,47 ± 1,76 ^a	7,00 ± 1,34 ^b	6,93 ± 1,60 ^c
3	4,97 ± 1,38 ^b	6,40 ± 1,54 ^a	6,30 ± 1,42 ^b	6,43 ± 1,43 ^c
4	6,73 ± 1,57 ^c	6,37 ± 1,71 ^a	7,03 ± 1,50 ^b	6,73 ± 1,74 ^c
5	5,80 ± 1,61 ^c	6,93 ± 1,34 ^a	6,77 ± 1,19 ^b	6,77 ± 1,33 ^c
6	6,47 ± 1,50 ^c	7,00 ± 1,34 ^a	7,67 ± 1,06 ^d	7,83 ± 1,12 ^f
7	6,03 ± 1,52 ^c	6,97 ± 1,43 ^a	7,57 ± 1,30 ^c	7,67 ± 1,24 ^d
8	7,23 ± 1,17 ^d	7,17 ± 1,51 ^a	7,67 ± 1,22 ^f	7,87 ± 1,31 ^g
9	5,87 ± 2,03 ^c	7,13 ± 1,63 ^a	7,77 ± 1,25 ^g	7,87 ± 1,17 ^h
10	6,00 ± 1,91 ^c	7,00 ± 1,44 ^a	7,67 ± 1,18 ^e	7,80 ± 1,10 ^e
11	6,67 ± 1,24 ^c	7,27 ± 1,55 ^a	7,33 ± 1,35 ^b	7,23 ± 1,10 ^c
12	5,87 ± 1,55 ^c	6,50 ± 1,59 ^a	6,63 ± 1,72 ^b	6,93 ± 1,46 ^c
13	5,37 ± 1,27 ^c	6,30 ± 1,73 ^a	6,13 ± 1,50 ^a	6,33 ± 1,56 ^a

Los valores están expresados como $\mu \pm S$: valor promedio (n=30) $\pm$ desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras según la prueba de Tukey (p < 0,05).

A continuación se analizan cada uno de los atributos:

Sabor

Mediante un análisis ANOVA con Valor-P < 0,05 (Apéndice D), se determinó que si existe diferencia significativa; es decir que al menos una de las muestras presentadas a los jueces fue diferente.

Empleando la prueba de Tukey (tabla 14) con un nivel de significancia de 5%, se pudo concluir que la muestra que presentó diferencia significativa fue la muestra 8700, la cual tuvo mayor grado de diferencia de acuerdo a la característica de sabor. Mientras que las muestras 2755 y 1057 presentaron menor diferencia al contrastarlo contra el estándar como se muestra en la figura 4.1

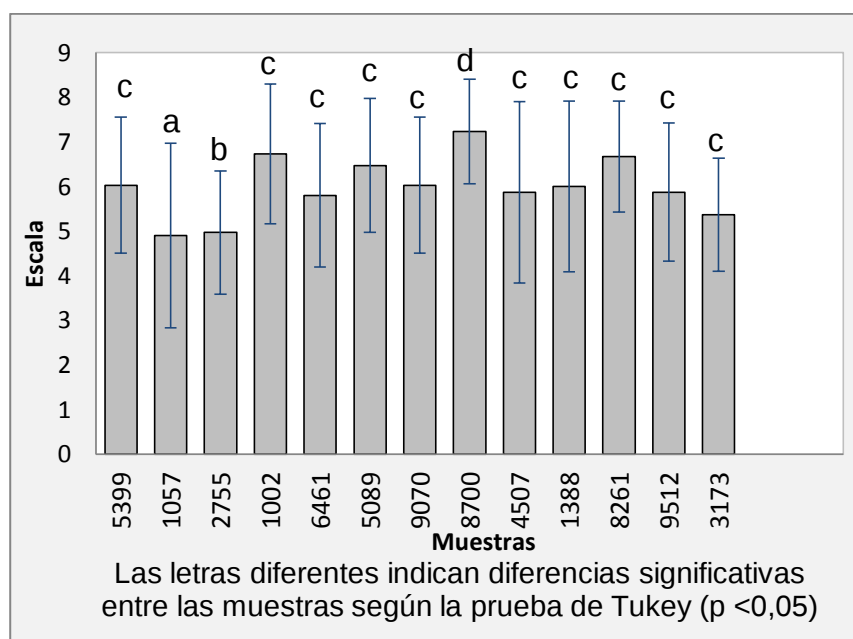


FIGURA 4.1 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo sabor.

Olor

Para el análisis estadístico se estableció que la hipótesis nula señalaba que todas las muestras presentaban el mismo olor, mientras que la alterna enunciaba que al menos una presentaba diferencia significativa. Con un valor p mayor a 0,05 ($p=0,122$), no existía evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, es decir que ninguna de las muestras presentaba diferencia significativa en cuanto al olor (Apéndice E).

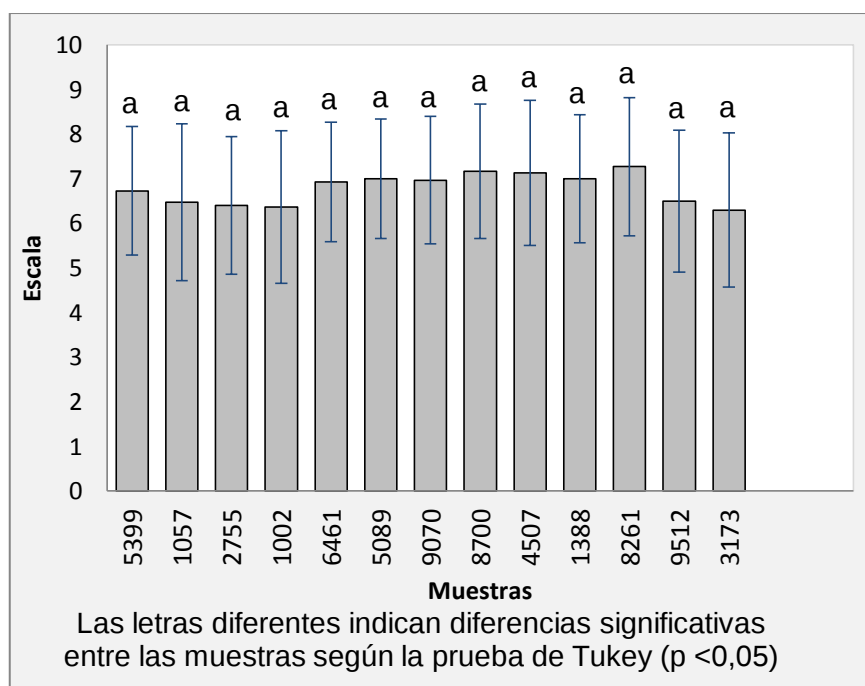


FIGURA 4.2 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo olor.

Color

De las diferentes formulaciones presentadas a los jueces, se determinó que si existía diferencia significativa entre sí, demostrado estadísticamente en el apéndice F, de acuerdo al análisis ANOVA realizado.

Los resultados obtenidos mostraron que las mezclas 9070, 1388, 4507 y 8700, presentaron mayor diferencia en cuanto al color que las demás, esto se lo interpreta conforme a la superioridad de sus medias, expresado con un nivel de confianza del 95% (figura 4.3).

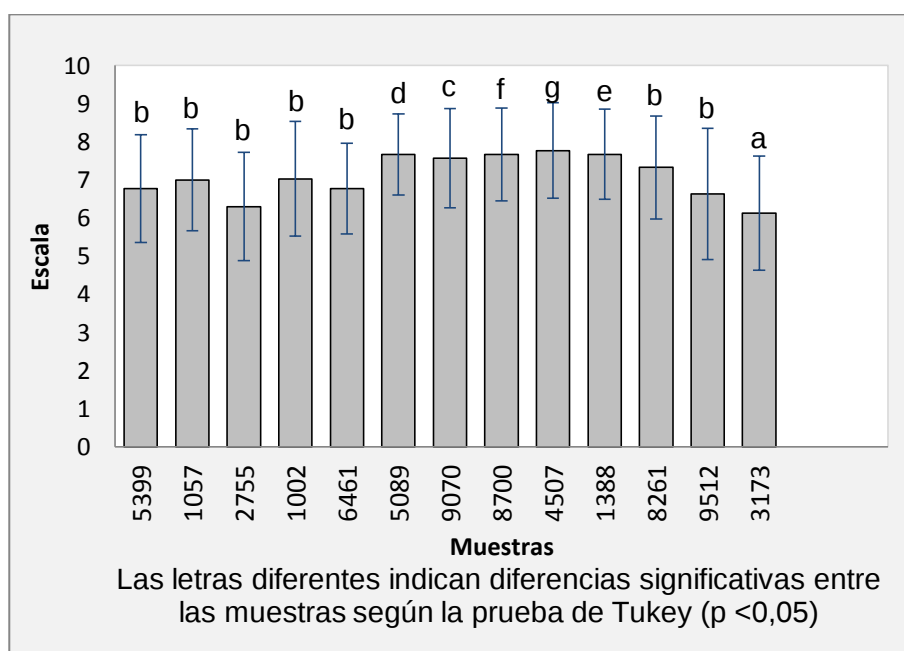


FIGURA 4.3 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo color.

Apariencia

En base a los resultados obtenidos en el apéndice G, se pudo afirmar con un nivel de confianza del 95%, que al menos una de las formulaciones presentaba diferencia significativa debido a que el Valor-P fue menor a 0,05. Por lo que se tuvo que definir cuál de ellas era la diferente, esto se lo realizó a través de la Prueba de Tukey (tabla 14).

Al 5% de significancia, dado que los promedios de las valoraciones sensoriales más altas correspondieron a las formulaciones 4507, 8700, 5089, 9070 y 1388 (figura 4.4), que fueron significativamente distintas a las otras, se concluyó que estas formulaciones presentaban mejor apariencia que las demás.

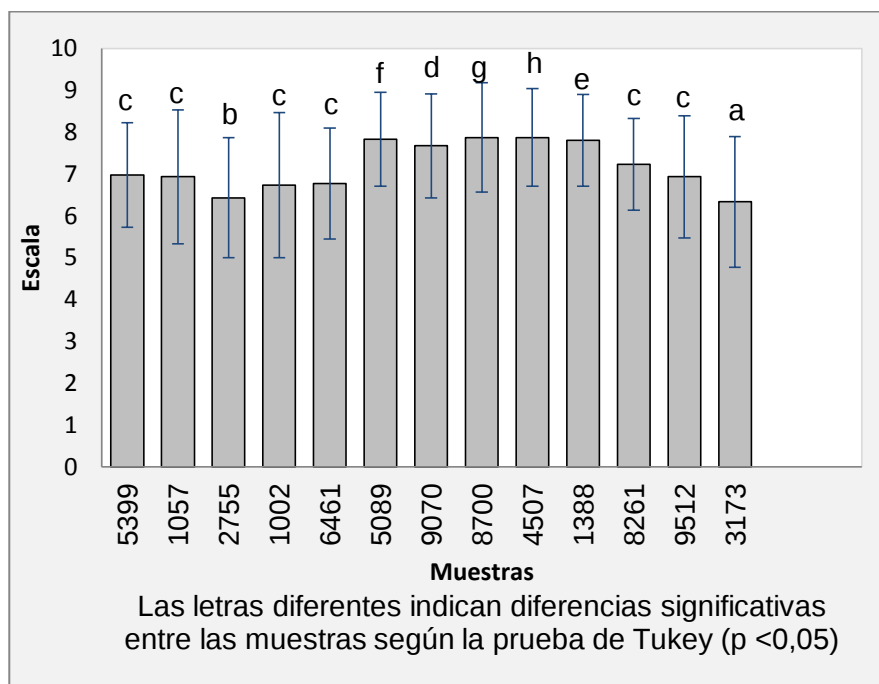


FIGURA 4.4 Gráfica de barras de los resultados obtenidos del atributo apariencia.

Consecutivamente, con el objetivo de maximizar el contenido de polifenoles totales de la formulación final se escogieron las cinco mezclas que presentaron las mejores características organolépticas evaluadas en el análisis sensorial; las mezclas: 5089, 9070, 8700, 4507 y 1388, para lo cual se planteó un modelo matemático (Ecuación 3) que relaciona el contenido de polifenoles (mg GAE/g muestra) y los porcentajes de los componentes del extracto en función de las muestras que presentaban las mejores propiedades sensoriales. Se procedió a realizar una optimización del

modelo en Microsoft Excel 2010 mediante la opción Solver; donde se definieron como variables (X_i) los porcentajes de cada componente como se presenta a continuación:

X_1 : Porcentaje de cascarilla de cacao

X_2 : Porcentaje de cascarilla de café

X_3 : Porcentaje de cascara de naranja

De acuerdo al objetivo del problema la función objetivo (Z) se estableció basado en el contenido de polifenoles de cada uno de los componentes correspondientes a las variables de decisión.

$$\textbf{Maximizar } Z = 4,55X_1 + 6,63X_2 + 27,81X_3 \quad [3]$$

El modelo estuvo sujeto a las siguientes restricciones:

a) Los porcentajes de residuos de la mezcla deben sumar 100%.

$$X_1 + X_2 + X_3 = 100$$

b) Restricciones de componentes, que expresan las cantidades mínimas y máximas de porcentaje en que los residuos deben encontrarse para conservar la calidad sensorial.

$$80,5 \leq X_1 \leq 99,25$$

$$0,0 \leq X_2 \leq 18,38$$

$$0,0 \leq X_3 \leq 1,13$$

c) Restricción de no negatividad.

$$X_1 + X_2 + X_3 \geq 0$$

Posteriormente, se aplicó Solver con las condiciones anteriormente establecidas de acuerdo a las cinco mejores formulaciones, maximizando de esta manera el contenido de polifenoles, sin descuidar las características sensoriales.

La fórmula optimizada se presenta en la tabla 15, donde se muestra el informe de respuesta de Solver, que manifiesta que para obtener 100% de extracto con el máximo contenido de polifenoles, se deben mezclar 80,5% de cascarilla de cacao, 18,37% de cascarilla de café y 1,13% de cáscara de naranja para elaborar el extracto de la bebida láctea. La cual

coincide con la formulación de la muestra 8700, constituyendo la formulación final.

Tabla 15
Resumen del informe de respuesta de Solver

Celda objetivo (Máx.)					
Celda	Nombre	Valor original	Valor final		
\$E\$13	% componentes F.O (Z)	0	5,19		
Celdas de variables					
Celda	Nombre	Valor original	Valor final		
\$B\$13	% componentes C. Cacao	0	80,5		
\$C\$13	% componentes C. Café	0	18,37		
\$D\$13	% componentes C. Naranja	0	1,13		
Restricciones					
Celda	Nombre	Valor de la celda	Fórmula	Estado	Demora
\$E\$18	Total de mezcla (%) LIE	100	\$E\$18=\$F\$18	Vinculante	0
\$E\$19	C. Cacao (%) LIE	80,5	\$E\$19>=\$F\$19	Vinculante	0
\$E\$20	C. Café (%) LIE	18,37	\$E\$20>=\$F\$20	No vinculante	18,37
\$E\$21	C. Naranja (%) LIE	1,13	\$E\$21>=\$F\$21	No vinculante	1,13
\$E\$22	C. Cacao (%) LIE	80,5	\$E\$22<=\$F\$22	No vinculante	18,75
\$E\$23	C. Café (%) LIE	18,37	\$E\$23<=\$F\$23	No vinculante	0,01
\$E\$24	C. Naranja (%) LIE	1,13	\$E\$24<=\$F\$24	Vinculante	0
\$B\$13	% componentes C. Cacao	80,5	\$B\$13>=0	No vinculante	80,5
\$C\$13	% componentes C. Café	18,37	\$C\$13>=0	No vinculante	18,37
\$D\$13	% componentes C. Naranja	1,13	\$D\$13>=0	No vinculante	1,13

4.2.2. Perfil sensorial del mejor tratamiento

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación sensorial y la optimización, la fórmula que presentó las

mejores características sensoriales (sabor, olor, color y apariencia) fue la muestra 8700, que contenía 80,5:18,37:1,13 de cascarilla de cacao, cascarilla de café y cascara de naranja, respectivamente.

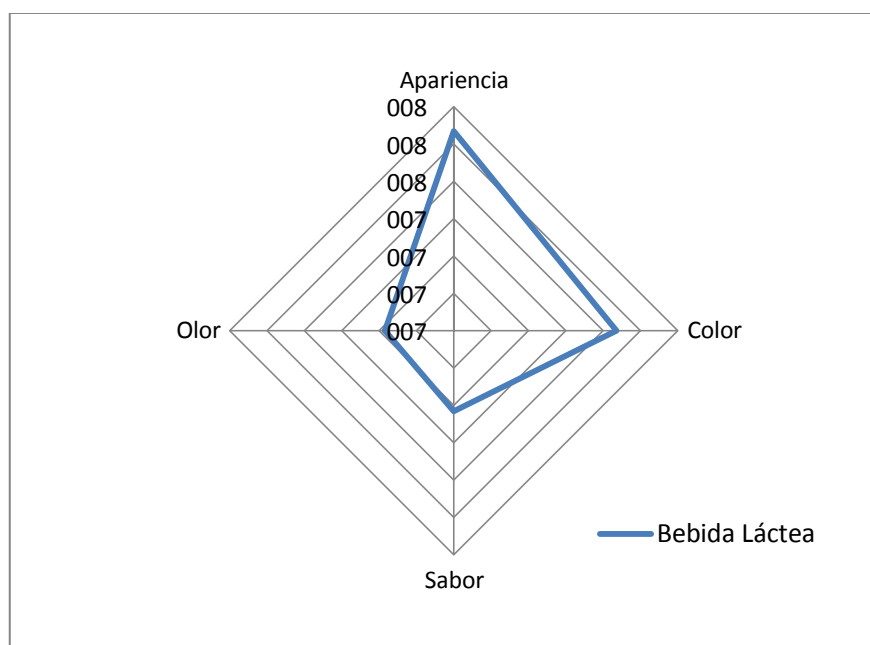


FIGURA 4.5 Perfil sensorial de la bebida láctea.

4.3. Caracterización del producto final

La importancia de caracterizar un producto alimenticio dirigido para el consumo humano es indispensable para su comercialización porque permite garantizar la calidad e inocuidad del producto. Es por ello, que una vez obtenida la mejor formulación se procedió a

realizar diversos análisis para conocer las características fisicoquímicas, microbiológicas y presencia de compuestos bioactivos de interés en el producto.

4.3.1. Análisis fisicoquímico

El análisis fisicoquímico consistió en la determinación de proteína, carbohidratos, grasas, fibra, cenizas, pH, grados Brix y densidad. En la tabla 16 se observa la composición proximal de la bebida láctea donde se puede resaltar su porcentaje proteico 3,16%.

Tabla 16

Composición proximal de la bebida láctea

Parámetro	(g)	(%)
Humedad	226,18±0,05	87,16
Carbohidratos	20,04*	7,71*
Proteínas	8,19±0,71	3,16
Grasas	5,09±0,09	1,97
Fibra	0,00	0

(*) Obtenido por diferencia de la composición proximal

Se recopiló los datos para realizar una comparación con un producto de la misma naturaleza que se encuentra en el mercado, (tabla 17). Se pudo concluir que ambos productos

poseen características fisicoquímica similares, cabe recalcar el porcentaje de proteína que en ambos casos oscila entre 8 (marca comercial) y 8,20 g (bebida láctea).

Tabla 17

Comparación de la composición proximal de la bebida láctea y marca comercial

Parámetro	Resultados (g)	
	Bebida láctea	Marca comercial
Humedad	226,18±0,05	189,5±0,09
Carbohidratos	20,04*	30
Proteínas	8,19±0,71	8
Grasas	5,09±0,09	4
Fibra	0,00	0
°Brix	13,7±0,06	15,8
Ph	6,41±0,02	6,58
Densidad (g/ml)	1,038	1,100

(*) Obtenido por diferencia de la composición proximal

Además, se realizó el perfil fisicoquímico del residuo del extracto (tabla 18) obtenido después de la cocción, el parámetro que resalta es el porcentaje de fibra, el cual se encuentra ($26,29 \pm 0,03$), y que de acuerdo a datos bibliográficos se podría emplear este residuo para alimentación animal (6).

Tabla 18
Composición proximal del residuo del extracto

Parámetro	%
Humedad	4,12±0,31
Grasas	5,22±0,40
Fibra	26,29±0,03
Cenizas Totales	5,57±0,47
Cenizas solubles en agua	2,31±0,15
Cenizas insoluble en ácido	1,80±0,14

4.3.2. Análisis microbiológico

Los alimentos es la principal fuente transmisora de enfermedades gastrointestinales, ya sea por una mala manipulación o alguna complicación durante la cadena productiva. Hoy en día, gracias a una serie de estudios se ha logrado conocer el origen, fuente de desarrollo y las patologías que provocan los microorganismos, por lo cual al referirse a un producto alimenticio dirigido hacia consumo humano es indispensable la realización de un análisis microbiológico para saber si existe presencia de alguna bacteria causante de las ETAs (38).

La caracterización microbiológica del producto terminado dio como resultado para los ensayos de *E. Coli* y coliformes totales, una vez transcurridas las 48 horas que requería el Kit RIDA®COUNT Coliform, no se observó crecimiento microbiano (Anexo D). Para aerobios mesófilos presentó $7,5 \times 10^2$ UFC/ml que está por debajo del límite permitido ($< 5,0 \times 10^4$ UFC/ml), en cuanto a *Listeria monocytogenes* hubo ausencia/25g de muestra (Anexo E), por lo que cumple con la norma de calidad NTE INEN 2564:2011 referente a bebidas lácteas.

4.4. Determinación de polifenoles y actividad antioxidante

Comparativamente el mayor porcentaje de polifenoles totales se observó en la bebida láctea ($4,99 \pm 0,34$ mg GAE/g muestra). Referente a la actividad antioxidante la bebida láctea posee $80,14 \pm 0,05$ %, mientras que la marca comercial tiene $55,54 \pm 0,03$ %. Ver tabla 19.

Tabla 19
Comparación de polifenoles y actividad antioxidante de la bebida láctea y marca comercial

Parámetro	Resultados	
	Bebida láctea	Marca comercial
Polifenoles totales (mg GAE/g muestra)	4,99 ± 0,34	3,93 ± 0,84
Actividad antioxidante (%)	80,14 ± 0,05	55,54 ± 0,03

Los tratamientos térmicos implican la pérdida de compuestos bioactivos, por lo que luego de la pasteurización se observa que existe una disminución de la actividad antioxidante en un 4,10%.

4.5. Determinación de cafeína

En el apéndice C se observa la curva de calibración de cafeína, la cual se graficó con los datos de concentración y área bajo el pico de las diferentes diluciones del estándar de cafeína. Esta curva presentó un coeficiente de correlación R^2 de 0,9981.

Para cada dilución se obtuvieron distintos valores de área bajo el pico y tiempos de retención cercanos, los cuales se muestran en la tabla 20. En el apéndice H se pueden observar los cromatogramas de las diferentes diluciones del estándar.

Tabla 20
Resultados HPLC del estándar de cafeína

Concentración de la dilución (ppm)	Tiempo de retención (minutos)	Área bajo el Pico (uV*sec)
25	3,830	316193,91
50	3,896	556270,86
100	3,810	1453251,75
200	3,830	2437939,14
400	3,836	4896812,49
600	3,781	7392766,22
800	3,781	10360759,28

Seguidamente, cada pico cromatográfico de las muestras fueron analizados en el rango estimado entre 3,810 y 3,896 minutos.

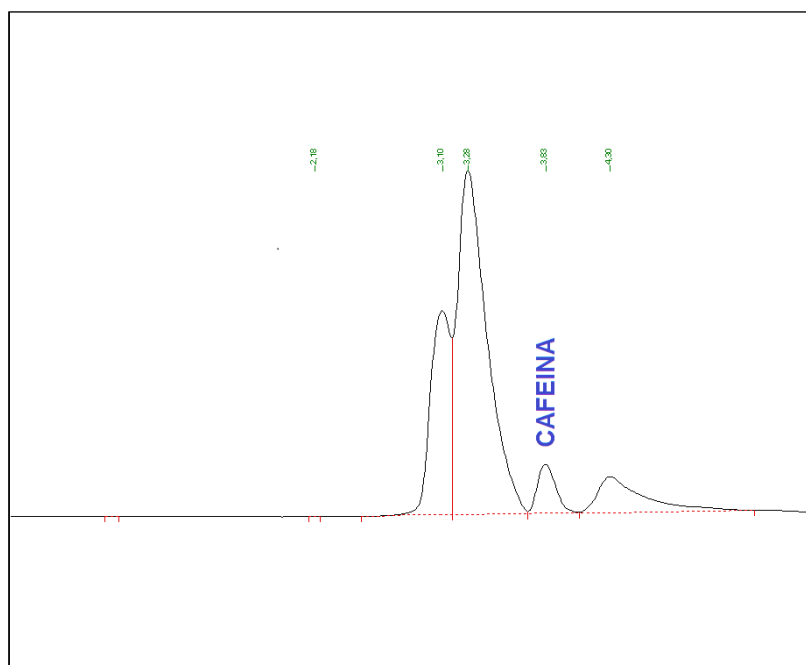


FIGURA 4.6 Cromatograma de la bebida láctea.

En la figura 4.6 se pueden observar cuatro picos en el cromatograma para la bebida láctea, se seleccionó el pico con tiempo de retención 3,835 minutos y un área bajo el pico de 765349,05, debido a que este tiempo de retención se encuentra dentro del rango determinado para la cafeína en la tabla 17.

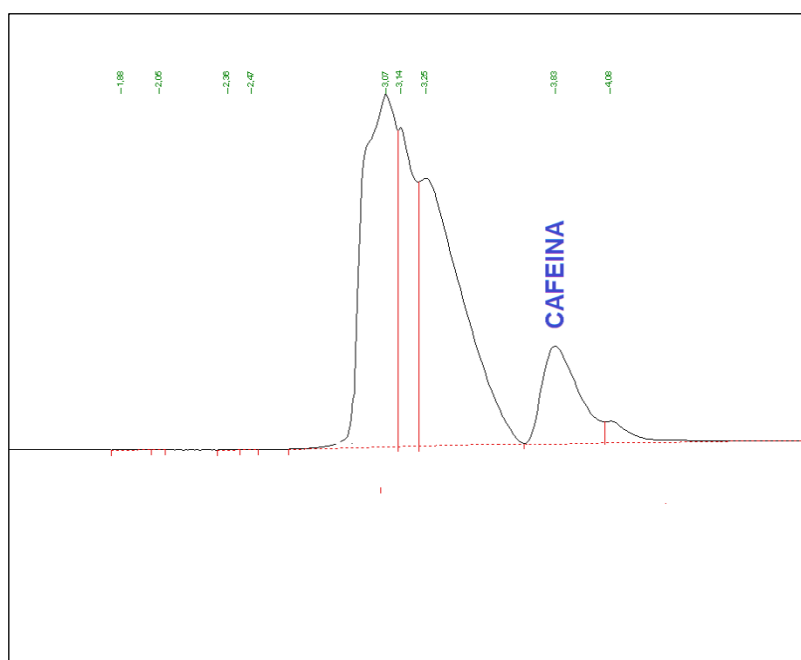


FIGURA 4.7 Cromatograma de la marca comercial.

En la figura 4.7 se observan varios picos en el cromatograma para la muestra de la marca comercial, se escogió el pico con tiempo de retención 3,334 minutos y un área bajo el pico de 638817,64 debido

a que este tiempo de retención se encuentra dentro del rango determinado para la cafeína en la tabla 17.

Por consiguiente, a partir de la ecuación de la curva de calibración las concentraciones de cafeína para la bebida láctea y la marca comercial fueron de 57,39 mg/L y 47,44 mg/L respectivamente.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten arribar a las siguientes conclusiones:

El mejor diseño experimental de mezcla se obtuvo con la proporción de 80,5 % de cascarilla de cacao; 18,37 % de cascarilla de café y 1,13 % de cáscara de naranja, evaluados sensorialmente por sus atributos de sabor, olor, color y apariencia. El contenido de polifenoles totales encontrados en la bebida láctea fue de $4,99 \pm 0.34$ mg GAE/g muestra.

La bebida láctea seleccionada presentó parámetros fisicoquímicos y microbiológicos dentro de los rangos establecidos por la norma NTE INEN 2564:2011 para bebidas lácteas.

Se encontró para la bebida láctea una actividad antioxidante de $80,14 \pm 0,05 \%$, lo que demuestra la posibilidad elaborar un producto a base de residuos agroindustriales con esta actividad y atributos sensoriales agradables.

El contenido de cafeína en la bebida láctea (57,39 mg/L) se encontró dentro del límite máximo de la ingesta diaria establecida por la FDA (300 mg).

5.2. Recomendaciones

Realizar un estudio de factibilidad económica para la elaboración de la bebida láctea a escala industrial.

Llevar a cabo una evaluación de la vida de anaquel del producto acompañada de la medición de polifenoles durante su almacenamiento para cuantificar las pérdidas y conocer la estabilidad de dichos compuestos.

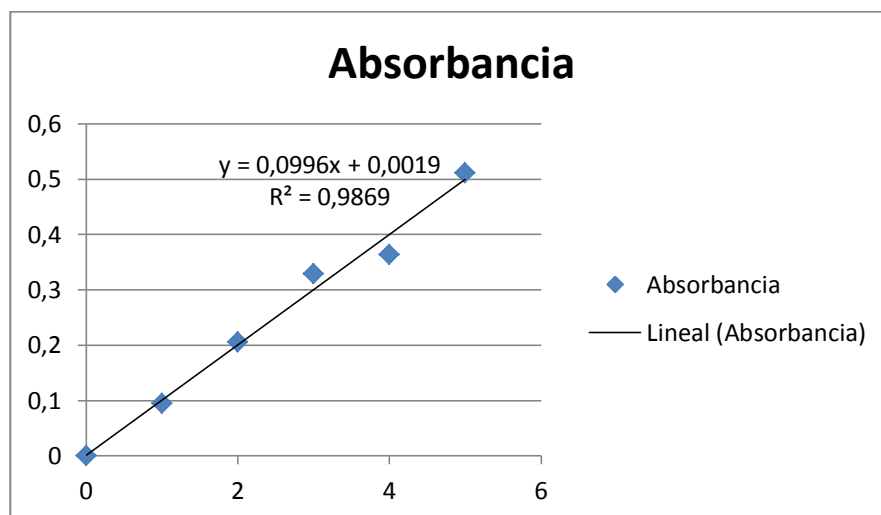
Mantener un adecuado manejo postcosecha de la cascarillas de cacao y café para evitar la presencia de ocratoxinas.

APÉNDICES

APÉNDICE A

CURVA DE CALIBRACION UTILIZANDO ÁC. GÁLICO COMO ESTÁNDAR A 765 nm. PARA DETERMINACION DE POLIFENOLES TOTALES.

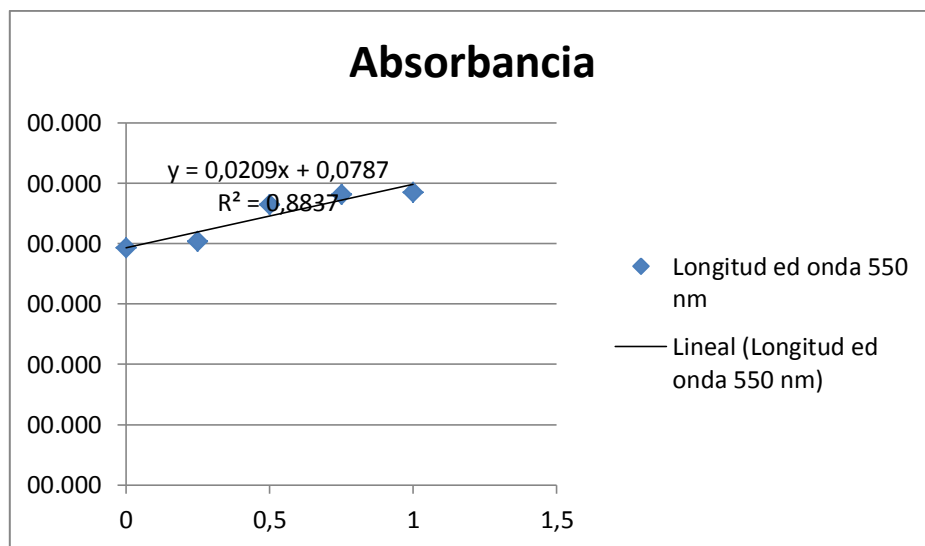
Con. Ac. Gálico (mg/L)	Absorbancia
0	0
1	0,095
2	0,206
3	0,329
4	0,364
5	0,511



APÉNDICE B

**CURVA DE CALIBRACION UTILIZANDO ALBUMINA COMO ESTÁNDAR
A 550 nm. PARA DETERMINACION DE PROTEINAS MEDIANTE EL
METODO DE BIURET.**

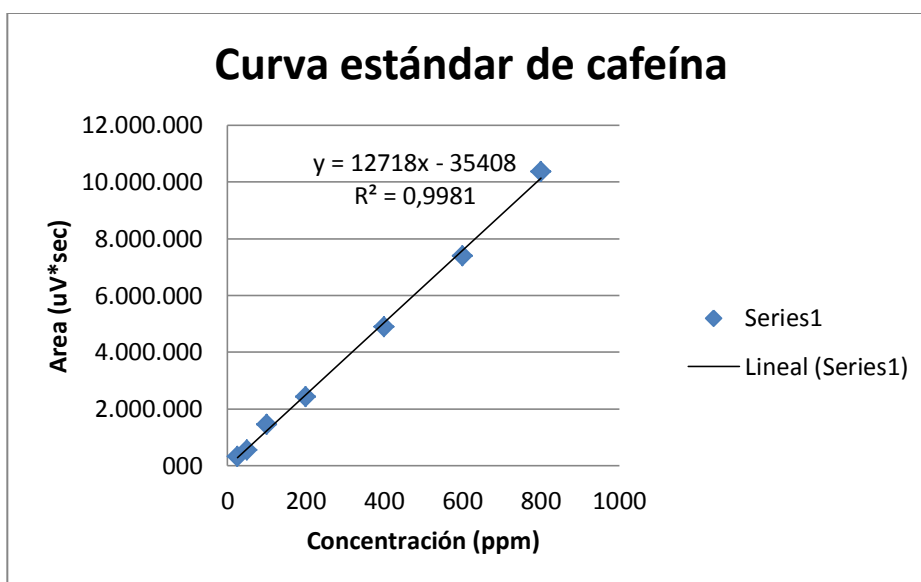
Concentración de la Solución Albúmina(mg/ml)	Absorbancia
0	0,079
0,25	0,081
0,5	0,093
0,75	0,096
1	0,097



APÉNDICE C

CURVA DE CALIBRACION UTILIZANDO CAFEINA COMO ESTÁNDAR A UNA CONCENTRACION DE 1000 PPM MEDIANTE EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Concentración de la Dilución (ppm)	Área (uV*sec)
25	316193,91
50	556270,86
100	1453251,75
200	2437939,14
400	4896812,49
600	7392766,22
800	10360759,28



APÉNDICE D

VALIDACIÓN ESTADÍSTICA PARA EL ATRIBUTO SABOR

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9 = \mu_{10} = \mu_{11} = \mu_{12} = \mu_{13}$

Ha: $\neg Ho$

Análisis Varianza un solo factor

ANOVA unidireccional: 5399; 1057; 2755; 1002; 6461; 5089; 9070; 8700; ...

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	12	164,32	13,69	5,42	0,000
Error	377	951,67	2,52		
Total	389	1115,99			

S = 1,59

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
8700	30	7,233	A
1002	30	6,733	A B
8261	30	6,667	A B C
5089	30	6,467	A B C
9070	30	6,033	A B C D
5399	30	6,033	A B C D
1388	30	6,000	A B C D
9512	30	5,867	B C D
4507	30	5,867	B C D
6461	30	5,800	B C D
3173	30	5,367	C D
2755	30	4,967	D
1057	30	4,900	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

APÉNDICE E

VALIDACIÓN ESTADÍSTICA PARA EL ATRIBUTO OLOR

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9 = \mu_{10} = \mu_{11} = \mu_{12} = \mu_{13}$

Ha: $\neg Ho$

Análisis Varianza un solo factor

ANOVA unidireccional: 5399; 1057; 2755; 1002; 6461; 5089; 9070; 8700; ...

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	12	40,77	3,40	1,42	0,152
Error	377	899,13	2,38		
Total	389	939,91			

S = 1,544

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
8261	30	7,233	A
8700	30	7,167	A
4507	30	7,133	A
1388	30	7,000	A
5089	30	7,000	A
9070	30	6,967	A
6461	30	6,933	A
5399	30	6,733	A
9512	30	6,500	A
1057	30	6,467	A
2755	30	6,400	A
1002	30	6,367	A
3173	30	6,300	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

APÉNDICE F

VALIDACIÓN ESTADÍSTICA PARA EL ATRIBUTO COLOR

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9 = \mu_{10} = \mu_{11} = \mu_{12} = \mu_{13}$

Ha: $\neg Ho$

Análisis Varianza un solo factor

ANOVA unidireccional: 5399; 1057; 2755; 1002; 6461; 5089; 9070; 8700; ...

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	12	112,37	9,36	5,12	0,000
Error	377	689,43	1,83		
Total	389	801,81			

S = 1,352

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
4507	30	7,767	A
8700	30	7,767	A
1388	30	7,667	A
5089	30	7,667	A
9070	30	7,567	A
8261	30	7,333	A B
1002	30	7,033	A B C
1057	30	7,000	A B C
6461	30	6,767	A B C
5399	30	6,767	A B C
9512	30	6,733	A B C
2755	30	6,300	B C
3173	30	6,133	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

APÉNDICE G

VALIDACIÓN ESTADÍSTICA PARA EL ATRIBUTO APARIENCIA

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9 = \mu_{10} = \mu_{11} = \mu_{12} = \mu_{13}$

Ha: $\neg Ho$

Análisis Varianza un solo factor

ANOVA unidireccional: 5399; 1057; 2755; 1002; 6461; 5089; 9070; 8700; ...

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	12	114,17	9,51	5,20	0,000
Error	377	689,90	1,83		
Total	389	804,07			

S = 1,353

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
4507	30	7,867	A
8700	30	7,867	A
5089	30	7,833	A
1388	30	7,800	A
9070	30	7,667	A
8261	30	7,233	A B
5399	30	6,967	A B
9512	30	6,933	A B
1057	30	6,933	A B
6461	30	6,767	A B
1002	30	6,733	A B
2755	30	6,433	B
3173	30	6,333	B

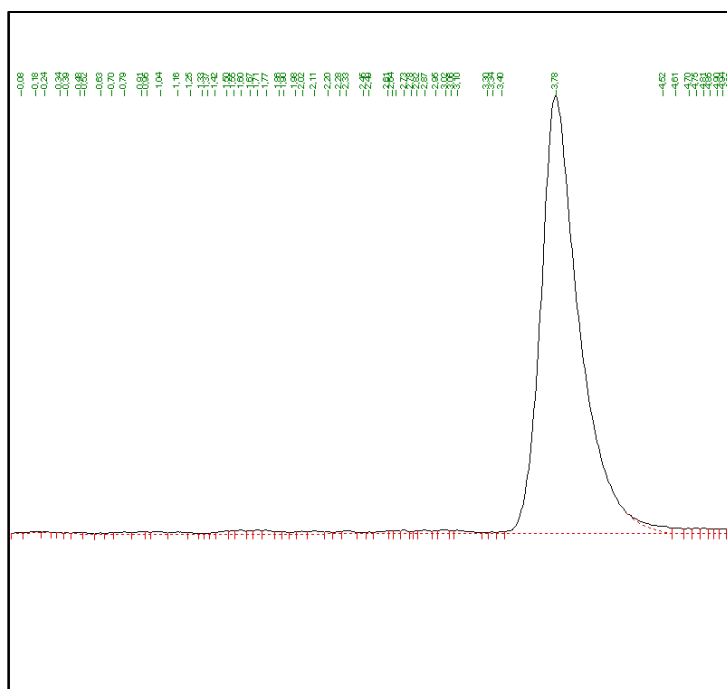
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%

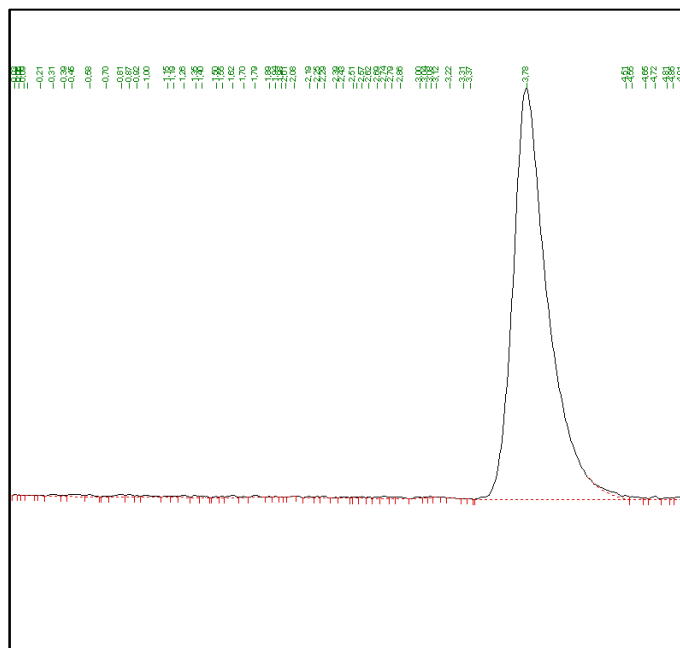
APÉNDICE H

CROMATOGRAMAS DE LAS DILUCIONES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR CAFEÍNA

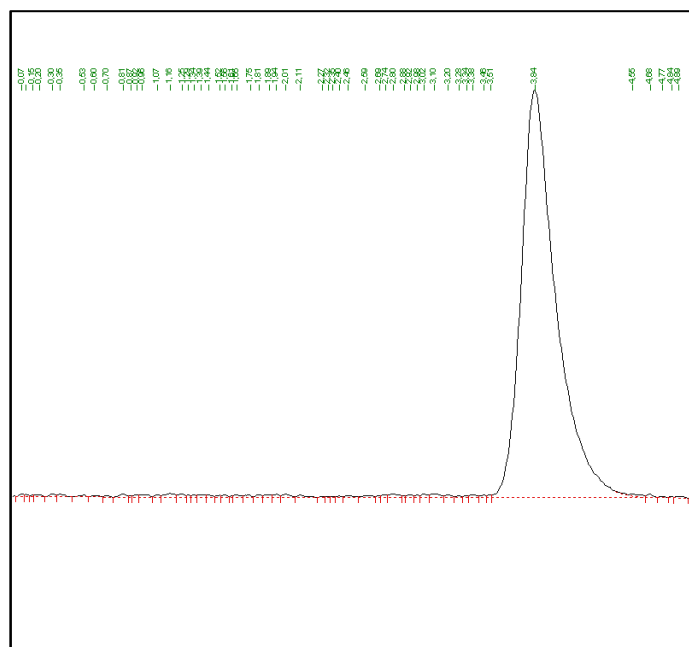
- DILUCIÓN A 800 PPM



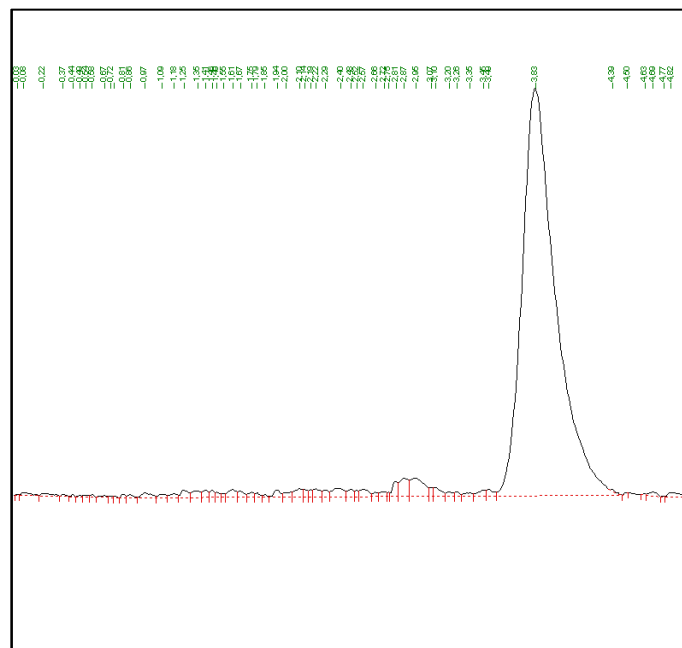
- DILUCIÓN A 600 PPM



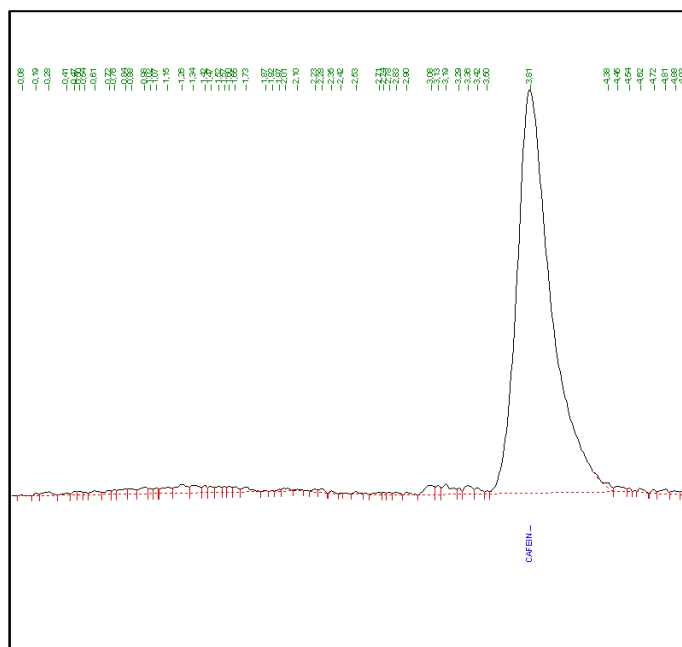
- DILUCIÓN A 400 PPM



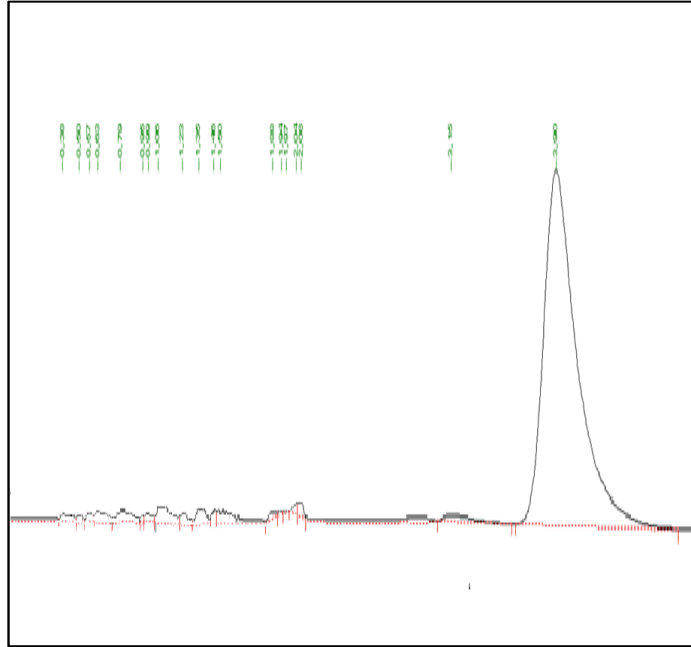
- DILUCIÓN A 200 PPM



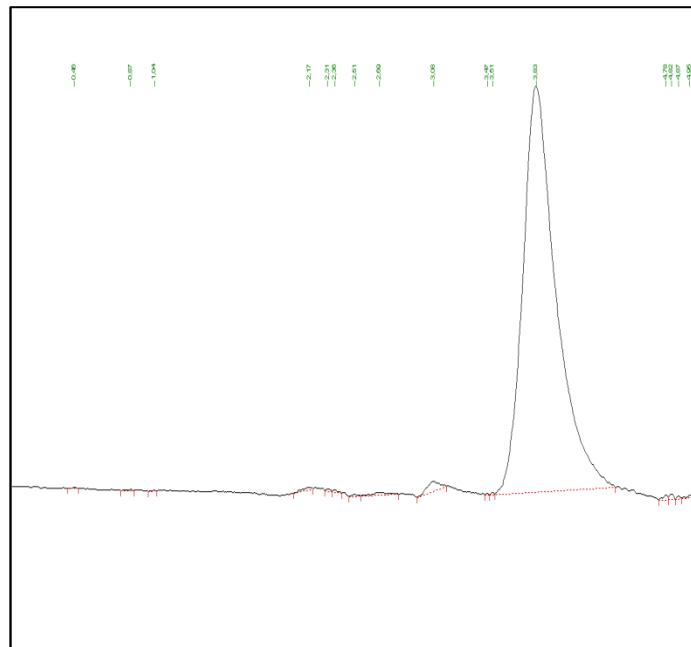
- DILUCIÓN A 100 PPM



- DILUCIÓN A 50 PPM



- DILUCIÓN A 25 PPM



ANEXOS

ANEXO A

ANALISIS MICROBIOLOGICO DE COLIFORMES TOTALES PARA MUESTRA DE CASCARILLA DE CAFÉ

	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL			
PROGRAMA DE SOPORTE DE SERVICIOS DE ALIMENTOS DE LA ESPOL				
				
DATOS DEL CLIENTE				
Contacto:	Karen Suarez Gianella Franco			
IDENTIFICACION DE LA MUESTRA				
Nombre:	Cascara de café tostado			
Tipo de muestra:	Café tostado y molido			
Fecha de recepción:	24 de febrero del 2014			
Fecha de análisis:	24 de febrero del 2014			
Código de la muestra:	CASCATOS			
ANALISIS MICROBIOLOGICO				
PARAMETRO	UNIDAD	RESULTADO	REQUISITO	METODO DE ENSAYO
Coliformes totales	NMP/g	2.1×10^4	3.0×10^0	NTE INEN 1123:2006
OBSERVACIONES				
La muestra NO cumple con los parámetros microbiológicos según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1123				

FECHA DE EMISION: Guayaquil, 26 de febrero del 2014

COPIA NO FIRMADA

Mario Guadalupe
ANALISTA

Msc. María Fernanda Morales
COORDINADORA PSSA

MSc. Haydee Torres
COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

ANEXO B

ANALISIS MICROBIOLOGICO DE COLIFORMES TOTALES PARA MUESTRA DE CASCARILLA DE CACAO

	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL			
PROGRAMA DE SOPORTE DE SERVICIOS DE ALIMENTOS DE LA ESPOL				
				
DATOS DEL CLIENTE				
Contacto:	Karen Suarez Gianella Franco			
IDENTIFICACION DE LA MUESTRA				
Nombre:	Cascara de cacao tostado			
Tipo de muestra:	Café tostado y molido			
Fecha de recepción:	24 de febrero del 2014			
Fecha de análisis:	24 de febrero del 2014			
Código de la muestra:	CASCOTOS			
ANALISIS MICROBIOLOGICO				
PARAMETRO	UNIDAD	RESULTADO	REQUISITO	METODO DE ENSAYO
Coliformes totales	NMP/g	1.5×10^1	3.0×10^0	NTE INEN 1123:2006
OBSERVACIONES				
La muestra NO cumple con los parámetros microbiológicos según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1123				
FECHA DE EMISION: Guayaquil, 26 de febrero del 2014				
COPIA NO FIRMADA				
Mario Guadalupe ANALISTA		Msc. María Fernanda Morales COORDINADORA PSSA		
MSc. Haydee Torres COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS				

ANEXO C

Nombre: _____ Fecha: _____

PRUEBA DISCRIMINATIVA

Producto: Bebida láctea

En la mesa frente a usted hay seis muestras de bebida láctea para que las compare en cuanto a SABOR.

Una de las muestras está marcada con “**R**” y las otras tienen códigos.
Pruebe cada de las muestras y compárelas con **R**, e indique su respuesta a continuación, marcando con una **X** donde corresponda:

Muestras	8261	9512	6386	7969	3173
Más deliciosa que R	_____	_____	_____	_____	_____
Igual que R	_____	_____	_____	_____	_____
Menos deliciosa que R	_____	_____	_____	_____	_____
Indique cual es la diferencia:					
Nada	_____	_____	_____	_____	_____
Ligera	_____	_____	_____	_____	_____
Moderada	_____	_____	_____	_____	_____
Mucha	_____	_____	_____	_____	_____
Muchísima	_____	_____	_____	_____	_____

Comentarios: _____

MUCHAS GRACIAS

Nombre: _____ Fecha: _____

PRUEBA DISCRIMINATIVA

Producto: Bebida láctea

En la mesa frente a usted hay seis muestras de bebida láctea para que las compare en cuanto a OLOR.

Una de las muestras está marcada con “**R**” y las otras tienen códigos.
Pruebe cada de las muestras y compárelas con **R**, e indique su respuesta a continuación, marcando con una **X** donde corresponda:

Muestras	8261	9512	6386	7969	3173
Más olorosa que R	_____	_____	_____	_____	_____
Igual que R	_____	_____	_____	_____	_____
Menos olorosa que R	_____	_____	_____	_____	_____
Indique cual es la diferencia:					
Nada	_____	_____	_____	_____	_____
Ligera	_____	_____	_____	_____	_____
Moderada	_____	_____	_____	_____	_____
Mucha	_____	_____	_____	_____	_____
Muchísima	_____	_____	_____	_____	_____

Comentarios: _____

MUCHAS GRACIAS

Nombre: _____ Fecha: _____

PRUEBA DISCRIMINATIVA

Producto: Bebida láctea

En la mesa frente a usted hay seis muestras de bebida láctea para que las compare en cuanto a COLOR.

Una de las muestras está marcada con “**R**” y las otras tienen códigos.
Pruebe cada de las muestras y compárelas con **R**, e indique su respuesta a continuación, marcando con una **X** donde corresponda:

Muestras	8261	9512	6386	7969	3173
Más clara que R	_____	_____	_____	_____	_____
Igual que R	_____	_____	_____	_____	_____
Menos clara que R	_____	_____	_____	_____	_____
Indique cual es la diferencia:					
Nada	_____	_____	_____	_____	_____
Ligera	_____	_____	_____	_____	_____
Moderada	_____	_____	_____	_____	_____
Mucha	_____	_____	_____	_____	_____
Muchísima	_____	_____	_____	_____	_____

Comentarios: _____

MUCHAS GRACIAS

Nombre: _____ Fecha: _____

PRUEBA DISCRIMINATIVA

Producto: Bebida láctea

En la mesa frente a usted hay seis muestras de bebida láctea para que las compare en cuanto a APARIENCIA

Una de las muestras está marcada con “**R**” y las otras tienen códigos.
Pruebe cada de las muestras y compárelas con **R**, e indique su respuesta a continuación, marcando con una **X** donde corresponda:

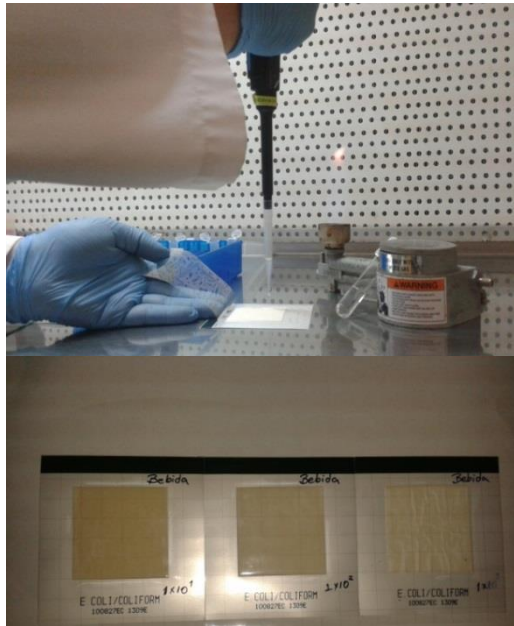
Muestras	8261	9512	6386	7969	3173
Más homogénea que R	_____	_____	_____	_____	_____
Igual que R	_____	_____	_____	_____	_____
Menos homogénea que R	_____	_____	_____	_____	_____
Indique cual es la diferencia:					
Nada	_____	_____	_____	_____	_____
Ligera	_____	_____	_____	_____	_____
Moderada	_____	_____	_____	_____	_____
Mucha	_____	_____	_____	_____	_____
Muchísima	_____	_____	_____	_____	_____

Comentarios: _____

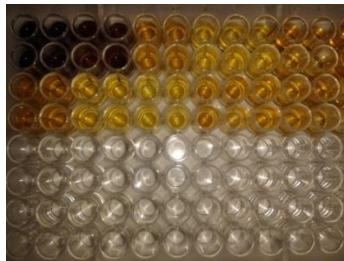
MUCHAS GRACIAS

ANEXO D

ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



Análisis microbiológico de la bebida láctea



Cambio de coloración de las muestras

ANEXO E

	ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL			
PROGRAMA DE SOPORTE DE SERVICIOS DE ALIMENTOS DE LA ESPOL				
				
DATOS DEL CLIENTE				
Nombre:	Gianella Franco			
Contacto:	Gianella Franco			
IDENTIFICACION DE LA MUESTRA				
Nombre:	bebida lactea			
Tipo de muestra:	Alimento listo para el consumo			
Fecha de recepcion:	16 de mayo del 2014			
Fecha de analisis:	16 de mayo del 2014			
Codigo de la muestra:	BL			
ANALISIS MICROBIOLOGICO				
PARAMETRO	UNIDAD	RESULTADO	REQUISITO	METODO DE ENSAYO
Aerobios Mesofilos	UFC/ml	7.5×10^2	$< 5.0 \times 10^4$	Compact dry "Nissui" TC
Listeria	ausencia-presencia/25g	ausencia	ausencia	AOAC RI 041101
OBSERVACIONES				
La muestra si cumple los requisitos de la norma NTE INEN 2564:2011 para los criterios microbiológicos de aerobios mesofilos y listeria.				

FECHA DE EMISION: Guayaquil, 29 de mayo del 2014

COPIA NO FIRMADA

Ing. Cristian Vargas F.
ANALISTA

Msc. María Fernanda Morales
COORDINADORA PSSA

MSc. Fabiola Cornejo
COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

BIBLIOGRAFIA

1. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones (PROECUADOR). (2013) *Análisis Sectorial de Café*. Recuperado el 20 de Marzo del 2014, de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/05/PROEC_AS2013_CAFE.pdf
2. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones (PROECUADOR). (2013). *Análisis del Sector Cacao y elaborados*. Recuperado el 20 de Marzo del 2014, de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf
3. Murillo I, Quilambaqui M. “Evaluación de 2 Dietas Experimentales con Diferentes Niveles de Cascarilla de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en las Fases de Crecimiento y Acabado de Cuyes (*Cavia porcellus* L.) de Raza Andina”. Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral; Guayaquil-Ecuador, 2008.
4. Bruna C, Eichholz I, Rohn S, Kroh LW, Huyskens-Keil S. Bioactive compound and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) from different origins. *Appl Bot Food Qual*. 2009;83:9–13.

5. Bouafou GM, Konan A, Zannou-Tchoko V, Kati-Coulibally S. Potential Food Waste and By-products of Coffee in Animal Feed. *Electron J Biol.* 2011;7(4):74–80.
6. Ecuador es el sexto mayor productor de cacao. (2014, Enero 01). *Diario el Comercio*. Guayaquil. p. 6.
7. Pätzold R, Brückner H. Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell. *Amino Acids.* 2006;31(1):63–72.
8. Olubamiwa O, Ikoyi S.M, Adebawale B.A, Omojola A.B, Hamzat R.A. Effect of Boiling Time on the Utilization of Cocoa Bean Shell in Laying Hen Feeds. *Int J Poult Sci.* 2006;5(12):1137–9.
9. Nsor-atindana J, Zhong F, Mothibe KJ. Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa (*Theobroma cacao* L .) Bean Shells. *Pakistan J Nutr.* 2012;11(7):574–9.
10. Pazmiño D. “Obtención de una infusión aromática a partir de la cascarilla de cacao de fino aroma”. Tesis de Grado, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador, 2013.

11. Llano J, Betancourt L. “Extracción de Pectinas a partir de los subproductos del beneficio del cacao”. Trabajo de Grado Investigación, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia, 2009.
12. Palacios L. “Caracterización de propiedades fluidodinámicas de lechos fluidizados en frío con mezclas de carbón-biomasas usadas en procesos de co-gasificación”. Trabajo de Grado, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia, 2005. p. 105-7
13. Prata E, Oliveira L. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. LWT - Food Sci Technol. 2007;40(9):1555–60.
14. García J. “Evaluación de la Cascarilla de Café para utilizarse como Sustrato en Cultivo Sin Suelo de Hortalizas”. Tesis de Grado. Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca de Juárez, México, 2008. 69 p.
15. Moposita D, Nuñez D. “Obtención de aceites esenciales de la cáscara de naranja a través del método de destilación por arrastre de vapor, utilizando tres concentraciones de bicarbonato de sodio para incrementar su rendimiento”. Tesis de Grado. Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador, 2012. 105 p.

16. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2012). *Estadísticas agropecuarias*. Recuperado el 20 de Marzo del 2014, de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
17. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2007. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
18. Díaz L. "Hidroextracción y fraccionamiento del aceite esencial de cáscara de naranja". Tesis de Grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 2005. 155 p.
19. Chalpartar Y, Villa A. Extracción de pectina de cáscara de naranja valenciana por calentamiento convencional, y estudio de pre-factibilidad técnico económico del proceso. Tesis de Grado, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. 1991.
20. Escobar M. "Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México". Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 2010. 101 p.

21. Altamirano S. “Desarrollo de una bebida funcional elaborada a base de extracto de muicle (*Justicia spicigera*)”. Tesis, Universidad Veracruzana, Xalapa, México, 2013. p. 27–9.
22. Velázquez M, Prieto B, Contreras R. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75. 2004. Julio – Septiembre, pp. 36 – 43.
23. Wildman R, Kelley M, Wallace T. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. Segunda Edición. Estados Unidos: CRC Press; 2006. p. 422
24. Paredes F, Clemente A. Polifenoles de aplicación en farmacia. *Offarm*. 2005. Septiembre; 24:85 – 94.
25. Rebolo S. “Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiros, Valdeorras y Riberira Sacra”. Tesis de Doctorado. Universidad Santiago de Compostela, Lugo. 2007. p. 31–2.
26. Shahidia F, Janithaa P.K, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1992;32(1):67–103.
27. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. 2002; 17(6):271–8.

28. Murcia M; et al. Polifenoles y flavonoides: su importancia en la prevención de enfermedades. En: Nuevos alimentos para nuevas necesidades. Madrid, España: Editorial Nueva Imprenta S.A.; 2003. p. 121–9.
29. Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana, Cuba: Editorial Félix Varela, 2012.
30. Miranda M, Cuéllar A. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Universidad La Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana, Cuba, 2000.
31. Holsinger V.H, Rajkowski K.T, Stabel J.R. Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. Rev Sci Tech. 1997;16(2):441–51.
32. Enright J.B, Sadler W.W, Thomas E.C. Thermal Inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to Pasteurization of Milk. United States Public Health Service, Public Health Monograph No. 47. 1957. p. 30.
33. Saltos S. H-A. *Sensometría - Análisis en el Desarrollo de Alimentos Procesados*. Riobamba, Ecuador: Editorial Pedagógica Freire; 2010. p. 9-13, 36-50, 185-190.

34. Anzaldúa-Morales A. *La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A.; 1994.
35. Unal G. Antioxidant activity of commercial dairy products. *Agro Food Industry hi-tech*. 2012;39 – 42.
36. Nestlé S.A. (2011, Abril). Café: aroma, sabor y salud. *NESVIDA*. p. 6 – 9.
37. Amaro P, Gómez P, Vita P. Instrumental analítico cromatografía líquida de alta eficiencia. 2008.
38. González L.J; et al. Enfermedades transmitidas por los alimentos: Análisis del riesgo microbiológico. *Rev Chil Infect*. 2010;27(6):513–24.

NORMAS

- Instituto Ecuatoriano de Normalización. 2013. *Hierbas Aromáticas. Requisitos*. NTE INEN 2392. Primera edición. Quito – Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. 2011. *Bebidas Lácteas. Requisitos*. NTE INEN 2564. Primera edición. Quito – Ecuador.

- Instituto Ecuatoriano de Normalización. 2006. *Café tostado y molido. Requisitos*. NTE INEN 1123. Primera edición. Quito – Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. 2013. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable*. NTE INEN 1529. Primera edición. Quito – Ecuador.