

Determinación de las Condiciones para la Hidrólisis de Sacarosa Presente en Mucílago de
Cacao CCN 51

Jhon Jairo Sarmiento Suárez

Trabajo de Grado en modalidad investigación para optar por el título de químico

Director:

Ing. Luis Javier López Giraldo

Dr. Química, bioquímica y ciencia de alimentos

Co-Director

Arley René Villamizar Jaimes

Químico, Msc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

*A mi madre
y a las madres de todos aquellos
que murieron luchando por una nueva Colombia.*

*“¡No han muerto!
Están en medio de la pólvora,
de pie, como mechas ardiendo”*

Pablo Neruda

Agradecimientos

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de alimentos, CICTA, en especial a mi director el profesor Luis Javier López y mi Codirector Arley René Villamizar, por darme la confianza y la oportunidad de llevar a cabo este trabajo.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Marco Teórico	15
1.1 El cacao (<i>Theobroma cacao L</i>).....	15
1.2 Mucílago de cacao	16
1.3 Hidrólisis de sacarosa	18
1.4 Reacciones secundarias durante los procesos de hidrólisis de disacáridos	21
1.5 Hidrólisis no catalítica de azúcares	22
1.6 Caracterización de azúcares usando Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). 23	
1.7 Detectores empleados para la determinación de azúcares por HPLC	24
2. Estado del Arte	25
2.1 Hidrólisis de azúcares usando resinas de intercambio iónico.....	25
2.2 Método para la determinación de sacarosa glucosa y fructosa en alimentos	27
3. Objetivos	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. Materiales y Metodología	29

HIDRÓLISIS DE SACAROSA EN MUCILAGO DE CACAO CCN51	7
4.1 Reactivos y muestras	29
4.2 Características del equipo y columna usada para la cuantificación de azúcares	29
4.3 Realización de la curva de calibración	30
4.4 Preparación de las muestras.....	31
4.5 Caracterización físico-química del mucílago filtrado	32
4.6 Hidrólisis catalítica del mucílago filtrado	32
4.7 Hidrólisis no catalítica del mucílago filtrado	34
4.8 Reutilización del catalizador	35
5. Resultados	36
5.1 Análisis de la curva de calibración.....	36
5.2 Caracterización fisicoquímica del mucílago filtrado.....	37
5.3 Hidrólisis catalítica del mucílago filtrado	38
5.4 Hidrólisis no catalítica de mucílago filtrado.....	42
5.5 Reutilización del catalizador	46
6. Conclusiones	48
Bibliografía	49
Apéndices.....	54

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Frutos de cacao frescos rodeados de mucílago.....	17
<i>Figura 2.</i> Hidrólisis catalítica de sacarosa. Adaptado de McMurry, 2007.....	18
<i>Figura 3.</i> Estructura resina Amberlite IR120 (Chakraborty et al., 2017).....	20
<i>Figura 4.</i> Hidrólisis de sacarosa usando una resina como catalizador	21
<i>Figura 5.</i> Conversión de la sacarosa en la hidrólisis catalítica.....	40
<i>Figura 6.</i> Diagrama de Pareto para efectos en hidrólisis catalítica	41
<i>Figura 7.</i> Superficie de respuesta del efecto de la temperatura (°C) y relación resina: sacarosa (R:S) sobre la hidrólisis catalítica.....	42
<i>Figura 8.</i> Rendimiento de la sacarosa en la hidrólisis no catalítica.....	44
<i>Figura 9.</i> Diagrama de Pareto para efectos en hidrólisis no catalítica	45
<i>Figura 10.</i> Superficie de respuesta del efecto de la temperatura (°C) y el tiempo (min) sobre la hidrólisis no catalítica	46
<i>Figura 11.</i> Rendimiento de la sacarosa durante la reutilización del catalizador	47

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Condiciones de hidrólisis encontradas en la literatura usando diversas resinas de intercambio iónico.</i>	25
Tabla 2. <i>Parámetros del equipo de HPLC para el análisis de azúcares</i>	30
Tabla 3. <i>Soluciones patrón de azúcares</i>	31
Tabla 4 <i>Valores máximos y mínimos del diseño experimental de hidrólisis catalítica</i>	34
Tabla 5. <i>Valores máximos y mínimos del diseño experimental de hidrólisis no catalítica</i>	35
Tabla 6 <i>Tiempo de retención de sacarosa, glucosa y fructosa</i>	36
Tabla 7. <i>Características de las curvas de calibración</i>	37
Tabla 8. <i>Resultados del análisis bromatológico</i>	38
Tabla 9. <i>Resultados hidrólisis catalítica de sacarosa</i>	39
Tabla 10. <i>Resultados hidrólisis no catalítica</i>	43

Lista de Anexos

	Pág.
Apéndice A. Resultados del análisis estadístico (Análisis de varianza ANOVA) de la hidrólisis catalítica.....	54
Apéndice B. Resultados del análisis estadístico (Análisis de varianza ANOVA) para la hidrólisis no catalítica.....	54
Apéndice C: Curvas de calibración del patrón de sacarosa	55
Apéndice D: Curvas de calibración del patrón de glucosa	55
Apéndice E. Curvas de calibración del patrón de fructosa	56

Lista de Abreviaturas

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CICTA	Centro de Ciencia y Tecnología en Alimentos
CCN-51	Colección Castro Naranjal 51
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
RI	Índice de refracción
R:S	Relación resina sacarosa
R²	Coefficiente de correlación
UV-Vis	Ultravioleta visible
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

RESUMEN**TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA HIDRÓLISIS DE SACAROSA PRESENTE EN MUCÍLAGO DE CACAO CCN 51¹****AUTOR: JHON JAIRO SARMIENTO SUÁREZ²****PALABRAS CLAVE:** Cromatografía líquida, azúcares, hidrólisis, resina.

DESCRIPCIÓN: Los lixiviados de cacao representan aproximadamente el 5% en peso del total del peso del fruto fresco; estos residuos son vertidos sin ningún tipo de control a las fuentes hídricas en las fincas cacaoteras. Sin embargo, estos residuos son ricos en azúcares como la glucosa, fructosa y sacarosa; razón por la cual podrían ser empleados como fuente de carbono en procesos de fermentación o como edulcorante en la formulación de alimentos. Pese a sus potenciales aplicaciones, el residuo tiene una fuerte cantidad de sacarosa que lo hace no deseable para llevar a cabo procesos de fermentación. A la fecha no hay reportes en los que se hidrolice este tipo de residuos para obtener azúcares que puedan ser fácilmente empleados en procesos de fermentación. Por lo tanto, en este trabajo se estudió el efecto de la temperatura y relación resina:sacarosa (p/p) sobre la hidrólisis catalítica y no catalítica de la sacarosa presente el mucílago filtrado de cacao (Var. *CCN-51*). Para esto se usó un diseño factorial 2² compuesto central rotatable + puntos centrales. Este modelo se usó para determinar la influencia de las variables estudiadas sobre la conversión de sacarosa.

En el proceso de hidrólisis catalítica, el diagrama de Pareto con un nivel de confianza del 95% muestra que tanto la temperatura como la relación resina:sacarosa (p/p) tienen influencia significativa sobre la hidrólisis catalítica de mucílago de cacao filtrado, por el contrario en la hidrólisis no catalítica la única variable que tiene un efecto significativo es el tiempo y no la temperatura. El proceso de hidrólisis usando como catalizador la resina Amberlite IR 120H tiene algunas ventajas respecto a la hidrólisis no catalítica, como el trabajo a bajas temperaturas, alcanzando conversiones de sacarosa de un 86%. Teniendo en cuenta que el catalizador es fácil de retirar de la solución, tiene una buena estabilidad y se activa de una manera sencilla, se reutilizó tres veces en hidrolisis sucesivas, experimento 8, en los cuales la conversión de sacarosa es cerca del 81% en todos los experimentos, concluyendo que el catalizador no presenta una pérdida de actividad.

¹ Trabajo de Grado

² Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Dr. Luis Javier López Giraldo; MSc. Arley R. Villamizar J.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF THE CONDITIONS FOR THE HYDROLYSIS OF SUCROSE PRESENT IN COCOA MUCILAGE TYPE CCN 51¹

AUTHOR: JHON JAIRO SARMIENTO SUÁREZ²

KEYWORDS: Liquid chromatography, sugars, hydrolysis, resin.

DESCRIPTION: The cocoa leachates represent approximately 5% by weight of the total weight of the fresh fruit; this waste is discharged without any control to the water sources in the cocoa farms. However, these residues are rich in sugars such as glucose, fructose and sucrose; which is why they could be used as a carbon source in fermentation processes or as a sweetener in food formulation. Despite its potential applications, the residue has a high amount of sucrose that makes it undesirable to carry out fermentation processes. To date there are no reports in which this type of waste is hydrolyzed to obtain sugars that can be easily used in fermentation processes. Therefore, in this work, the effect of the temperature and ratio of resin: sucrose (w/w) on the catalytic and non-catalytic hydrolysis of the sucrose present in the filtered cocoa mucilage (Var CCN-51) was studied. For this, a rotatable central composite factorial design + central points was used. This model was used to determine the influence of the variables studied on the sucrose conversion.

In the process of catalytic hydrolysis, the Pareto diagram with a confidence level of 95% shows that both the temperature and resin: sucrose ratio (w / w) have a significant influence on the catalytic hydrolysis of filtered cocoa mucilage by the In the non-catalytic hydrolysis, the only variable that has a significant effect is time and not temperature. The hydrolysis process using the Amberlite IR 120H resin as a catalyst has some advantages over non-catalytic hydrolysis, such as working at low temperatures, achieving 86% sucrose conversions. Taking into account that the catalyst is easy to remove from the solution, has a good stability and is activated in a simple way, it was reused three times in successive hydrolysis, experiment 8, in which the saccharose conversion is close to 81 % in all experiments, concluding that the catalyst does not show a loss of activity.

¹ Workdegree

² Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Dr. Luis Javier López Giraldo; MSc. Arley R. Villamizar J.

Introducción

El aprovechamiento de subproductos agrícolas surge debido a la creciente escasez de recursos naturales y problemas ambientales, tendiendo a convertir estos subproductos en ingredientes alimentarios como bebidas de baja concentración alcohólica y néctar (Sendra et al., 2009). El mucílago de cacao de la especie "Colección Castro Naranjal 51" (CCN-51) tiene un alto potencial para ser utilizado como un ingrediente en el procesamiento de alimentos como refrescos, vinos, mermeladas y vinagre por su alto contenido de azúcares (Oddoye, Agyente-Badu, & Gyedu-Akoto, 2013). Vera et al. realizaron la caracterización de los azúcares presentes encontrando concentraciones de 6,15% de sacarosa, 5,08% de fructosa y 4,67% de glucosa (Vera, 2013).

El cacao CCN-51 es conocido por la resistencia que presenta frente a condiciones climáticas específicas y su alto rendimiento, por lo tanto, se comercializa mayormente como cacao a granel (Herrmann et al., 2015). En el proceso de beneficio (fermentación y secado) se han identificado compuestos precursores de aromas deseables e indeseables, llegándose a proponer métodos alternativos de beneficio con el fin de mejorar las características sensoriales de las masas de cacao obtenidas a partir de este material (Pallares, 2016). En Colombia se estima que hay cerca de 170.106 hectáreas sembradas en cacao con una producción de 70.106 toneladas en el 2017 (Agronet, 2018).

Durante el proceso de poscosecha se generan subproductos como el mucílago de cacao que son aptos para ser hidrolizados para aumentar el contenido de monosacáridos. Algunos de los catalizadores sólidos encontramos las zeolitas, resinas, arcillas, sílices y otros óxidos, los cuales se han usado para hidrolizar hemicelulosa, celobiosa, sacarosa y maltosa (Chem, 2014).

Para realizar un seguimiento del grado de conversión de disacáridos en monosacáridos se ha usado la cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción. Esta técnica es fácil de usar, obteniendo resultados que son exactos y reproducibles; garantizando el seguimiento del proceso de hidrólisis (Hurst, Martin, & Zoumas, 1979).

Existen antecedentes del uso de hidrólisis química para producir azúcares simples (fructosa y glucosa) que pueden emplearse en alimentos (Johnson et al., 2009). Por lo anterior, el presente trabajo busca determinar las mejores condiciones para hidrolizar la sacarosa presente en el mucílago de cacao, con el fin de obtener jarabes con un mayor contenido de glucosa y fructosa.

1. Marco Teórico

1.1 El cacao (*Theobroma cacao L*)

El cacao (*Theobroma cacao L*) inicia su historia en los pueblos Olmeca y Maya del golfo de México, quienes creían que el cacao les había sido entregado directamente por los dioses. El

cacao fue introducido en la corte real española a mediados de 1550 y sus derivados continúan teniendo un atractivo especial en la cultura moderna (Bennett, 2003).

Actualmente es un importante cultivo comercial en todo el mundo. Hay entre 5 y 6 millones de agricultores en los países en desarrollo que producen alrededor del 90% de la producción de cacao; así mismo, 40 a 50 millones de personas dependen del cacao para su sustento. Durante el procesamiento del cacao se generan grandes cantidades de residuos. La cáscara de vaina de cacao, las cáscaras de cacao y el mucílago de cacao son los tres principales subproductos generados (Martínez et al., 2012).

1.2 Mucílago de cacao

Cuando se extraen los granos de cacao, éstos se encuentran cubiertos por una masa blanca (mucílago) tal y como se muestra en la Figura 1. La presencia de mucílago en la capa del grano protege la planta durante extensos períodos de sequía por medio de la absorción de agua facilitando la germinación. Sin embargo, cuando se almacenan los granos de cacao la presencia de mucílago afecta negativamente a la germinación (Adu, Cobbinah, Asare, Yawson, & Taah, 2017).

Se le denomina sudoración de cacao, al líquido amarillento pálido que se genera producto de la descomposición del mucílago que rodea el grano de cacao fresco y es un subproducto residual de la industria del cacao. El mucílago constituye aproximadamente el 10% del peso del fruto de cacao (Adams, Dougan, Glossop, Twiddy, & Britain, n.d.).

El mucílago es altamente ácido debido a su bajo pH de aproximadamente 4,05, indicando la presencia de ácidos orgánicos como el láctico, acético y cítrico, siendo el último el que se encuentra en mayor proporción. Una ventaja de su acidez es que lo mantiene libre de bacterias contaminantes (Quizhpi, 2016).



Figura 1. Frutos de cacao frescos rodeados de mucílago.

Se ha demostrado que el mucílago puede ser estabilizado con la adición de productos químicos y tratamiento térmico; sin embargo, por las nuevas tendencias de los consumidores hacia productos naturales no es recomendable realizar la adición de estos productos, cuando el mucílago de cacao es utilizado en la preparación de bebidas alcohólicas la microfiltración mejora las características organolépticas de la bebida y a temperaturas entre 20°C y 30°C se mantienen

estables las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas por aproximadamente 28 días (Vera, 2013).

El mucílago de cacao contiene cerca de un 14-15 % en peso de azúcares (disacáridos y monosacáridos); el porcentaje restante corresponde a agua (80 -90 %), pectina (2 – 3%) y sales minerales (1%), en lo que respecta a los azúcares alrededor del 60% es sacarosa y el restante es una mezcla de glucosa y fructosa (Santana, 2017).

1.3 Hidrólisis de sacarosa

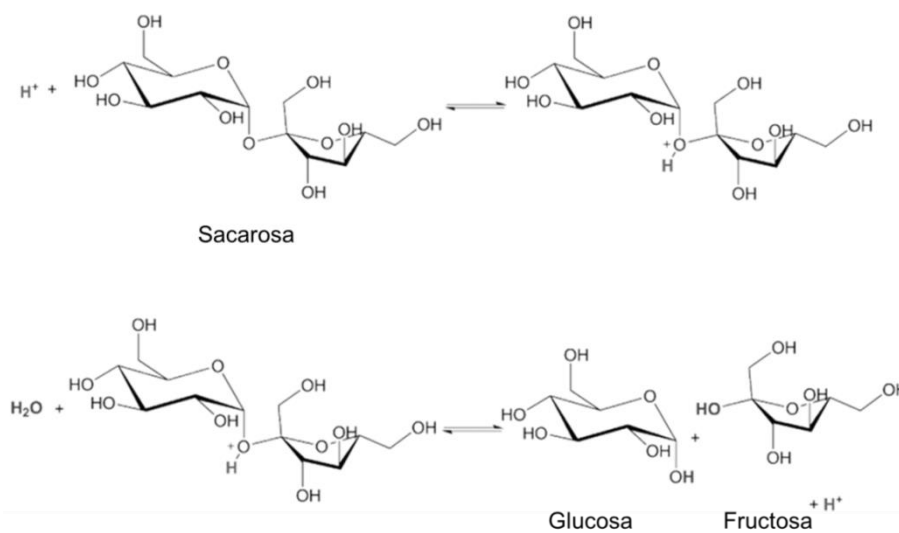


Figura 2. Hidrólisis catalítica de sacarosa. Adaptado de McMurry, 2007.

Los catalizadores heterogéneos son usados ampliamente en procesos de refinación del petróleo, tales como craqueo catalítico fluido e isomerización (Marcilly, 2006). Estos catalizadores pueden ser el reemplazo de los catalizadores enzimáticos en la hidrólisis de sacarosa, dando como

resultado la obtención de glucosa y fructosa en una reacción de una etapa como se muestra en la Figura 2; guardando una alta actividad catalítica y selectividad.

Con este tipo de hidrólisis se obtiene glucosa que puede ser empleada como materia prima en la síntesis de productos químicos, tales como como sorbitol, ácido glucárico, entre otros (Dhepe, Ohashi, Inagaki, Ichikawa, & Fukuoka, 2005).

Los catalizadores ácidos sólidos tienen varias ventajas sobre los catalizadores ácidos líquidos: facilidad de separación del producto, reciclabilidad y menos daño al reactor. En la hidrólisis de los enlaces glicosídicos los catalizadores alcanzan rendimientos de hasta un 90% (Kim, Hendrickson, Mosier, & Ladisch, 2005). Además, el uso de catalizadores ácidos sólidos puede reducir los contaminantes que tendrán un impacto sobre el medio ambiente (Huang & Fu, 2013).

La hidrólisis de sacarosa utilizando la enzima invertasa como catalizador es un proceso que se aplica comúnmente en la industria alimentaria para mejorar la calidad del sabor del producto (Balía, Grosso, Tronci, & Desogus, 2017). El uso de enzimas en este proceso tiene una serie de inconvenientes, baja estabilidad térmica, problemas de separación y recuperación de la enzima y del producto. Una alternativa es reemplazar los catalizadores enzimáticos no soportados con catalizadores heterogéneos (Okuhara, 2002).

La hidrólisis de sacarosa se ha llevado a cabo utilizando catalizadores heterogéneos, como zeolitas, poliestireno con grupos de ácido sulfónico y sílice mesoporosa sulfonada (Pito, Fonseca, Ramos, Vital, & Castanheiro, 2012). La utilización de catalizadores sólidos para la hidrólisis ácida de disacáridos se ha estudiado con gran detalle en la lactosa usando varias resinas de intercambio iónico. En comparación con la hidrólisis enzimática, la utilización de las resinas

de intercambio iónico ofrece la ventaja de no ser inhibida por los productos (Hahn-Hägerdal, Skoog, & Mattiasson, 1983).

En general, los catalizadores heterogéneos con buenas actividades catalíticas poseen sitios catalíticos y sitios de adsorción, así como una mayor superficie específica. Muchos tipos de catalizadores heterogéneos, tales como zeolitas, óxidos de metales, y resinas sulfonadas, se han usado en la hidrólisis de celulosa (Zhu, Gan, Li, & Yang, 2017).

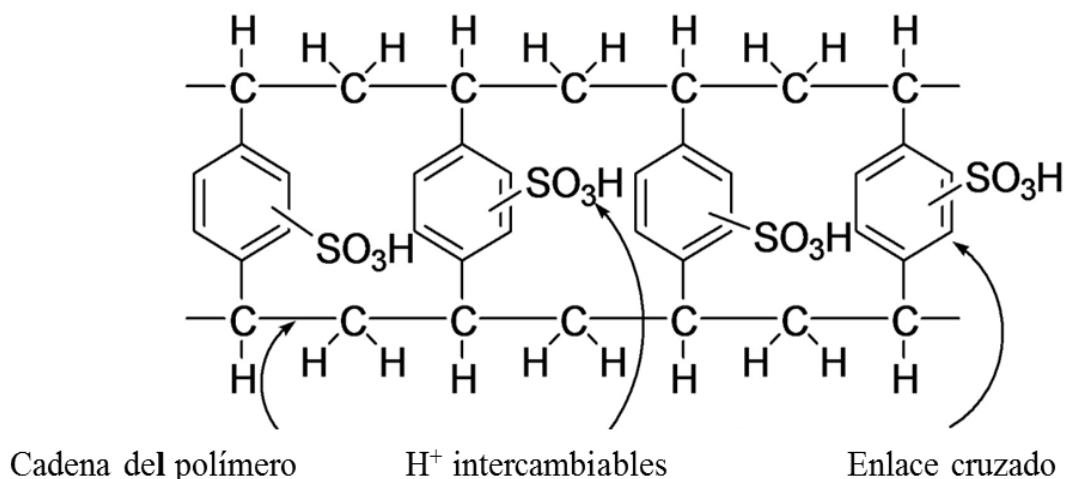


Figura 3. Estructura resina Amberlite IR120 (Chakraborty et al., 2017)

Se han logrado sintetizar resinas tipo Amberlite, un polímero de poliestireno con grupos sulfonados, (P- SO_3H) como se muestra en la figura 3. En la cual los grupos sulfonados interactúan con grupos OH de las moléculas de celulosa para adsorber el sustrato sobre la superficie del catalizador, seguido se hidrolizan los enlaces glicosídicos por los grupos sulfónicos, logrando rendimientos de hasta un 93% y a una temperatura de 393 K durante 10 h (Yabushita, 2016).

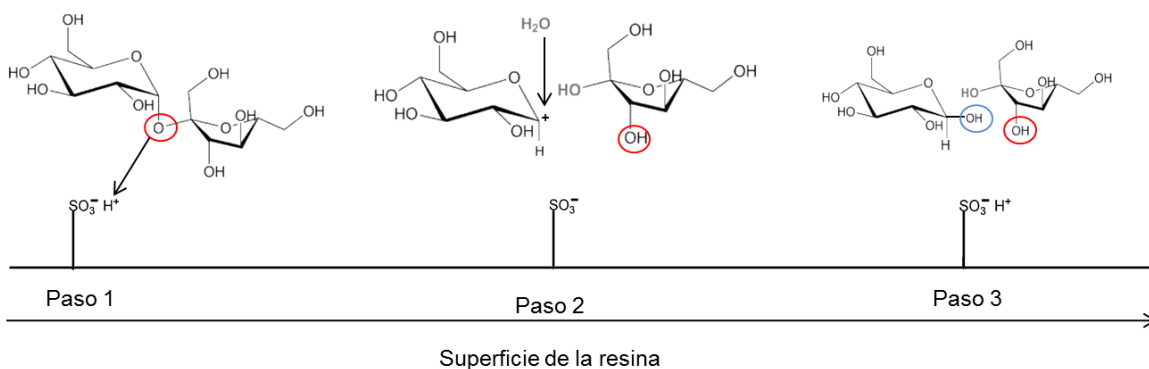


Figura 4. Hidrólisis de sacarosa usando una resina como catalizador

La cinética de la hidrólisis heterogénea de sacarosa usando como catalizador una resina de intercambio iónico se ha investigado con anterioridad. Teniendo en cuenta factores como la temperatura y el tamaño de partícula sobre la cinética de reacción, a su vez se han usado diferentes resinas como Amberlite IR-120, Dowex 50W-X8 y Amberlist IR-15 (Adnadjevic & Jovanovic, 2012). La hidrólisis de sacarosa se expresa como una inversión y la mezcla equimolar resultante de glucosa y fructosa se denomina azúcar invertido como se muestra en la figura 4. El término se basa en un cambio de rotación específica durante la hidrólisis. Las mutarrotaciones que siguen a la hidrólisis de los disacáridos se dan sobre carbono anomérico (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009).

1.4 Reacciones secundarias durante los procesos de hidrólisis de disacáridos

El pardeamiento no enzimático o las reacciones de Maillard deben ser consideradas cuidadosamente en procesos de suministro de calor, tales como pasteurización, deshidratación y

esterilización de los alimentos. Como resultado de este tipo de reacciones, se puede observar en algunos alimentos, que después de realizados estos procesos los alimentos toman tonalidades marrones u oscuras. En particular, a condiciones ácidas o neutras (pH 3-7) y en presencia de aminoácidos en el medio los azúcares reductores no son estables. Esto implica que en la reacción de Maillard haya una condensación que involucra una molécula que contiene un grupo amino primario, especialmente aminoácidos, polipéptidos y proteínas y un azúcar reductor con un grupo carbonilo, por ejemplo la glucosa o fructosa (Parisi & Luo, 2018).

1.5 Hidrólisis no catalítica de azúcares

La autohidrólisis en comparación con otros procesos es respetuosa con el medio ambiente, debido a que otros procesos utilizan productos químicos como agentes hidrolíticos (Conde, Moure, Domínguez, & Carlos, 2011). Este tipo de proceso hidrotérmico se conoce con diferentes nombres como: autohidrólisis, licuefacción acuosa, extracción acuosa, pretratamiento acuoso, pretratamiento hidrotérmico, prehidrólisis acuosa y cocción a presión en agua (Moniz, Carvalheiro, & Duarte, 2016).

Trabajando a temperaturas entre 150 y 230 °C, el enlace O-H del agua comienza a debilitarse, permitiendo la autoionización en iones hidronio ácidos (H_3O^+) que actúan como catalizadores e iones hidróxido básicos (OH^-). A estas temperaturas, la constante de ionización (K_w) del agua aumenta con la temperatura. Además, los iones hidronio generados a partir de la autoionización del ácido acético actúan de igual manera como catalizadores, mejorando la cinética de la

reacción. Como los iones hidronio generados a partir de los grupos acetilo tienen un papel importante en la hidrólisis, este proceso funciona mejor para los materiales que tienen un contenido significativo de grupos acetilo, como es el caso de las maderas duras y la mayoría de los residuos agrícolas (A. Ruiz, Rodri, Fernandes, Vicente, & Teixeira, 2013).

1.6 Caracterización de azúcares usando Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC permite la separación y cuantificación de sustancias o grupos de sustancias en poco tiempo. La cromatografía líquida de alta eficiencia posee determinadas ventajas al momento de realizar análisis de azúcares, debido a su gran solubilidad en agua y su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.

Así mismo, esta técnica analítica es una de la más utilizada debido a su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, posee una gran adaptabilidad a sustancias de gran importancia en la industria como: aminoácidos, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, antibióticos, terpenos, proteínas, plaguicidas, esteroides, especies organometálicas y una gran variedad de sustancias inorgánicas (P. C. Ruiz, 2014).

En HPLC la elución de los compuestos se puede llevar a cabo usando una mezcla de disolventes. Si la composición de la mezcla de disolventes permanece constante a lo largo de la etapa de elución, ésta se denomina isocrática. Por otro lado, cuando la composición de la mezcla de disolventes varía en el transcurso de la etapa de elución, se le denomina elución en gradiente (Bélanger, Jocelyn Paré, & Sigouin, 1997).

1.7 Detectores empleados para la determinación de azúcares por HPLC

La mayoría de los detectores se basan en fenómenos muy comunes y son, con algunas excepciones, modificaciones de la tecnología existente y no se basan en principios nuevos; entre ellos encontramos, el ultravioleta (UV), índice de refracción (RI), fluorescencia, detectores electroquímicos, dispersión de luz entre otros (Miller, 2005).

El detector ideal para HPLC debe tener una sensibilidad adecuada, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal y debe ser no destructivo. Un detector, único para todos los compuestos químicos, con estas cualidades es imposible de tener; por lo tanto, el sistema de detección utilizado dependerá de la naturaleza de la muestra. Los detectores de índice de refracción RI son los más usados en el análisis de azúcares por HPLC (Martínez Montera, Rodríguez Doderó, Guillén Sánchez, & Barroso, 2004).

El detector de RI mide el cambio entre el índice de refracción del disolvente puro y del disolvente con la muestra que salen de la columna. Si las dos soluciones difieren en su índice de refracción se produce una desviación del haz incidente y varía la señal. El detector de RI es universal, pero tiene algunas desventajas, baja sensibilidad y estabilidad y no puede usarse con elución de gradiente (Herrera, 2011).

Para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa en jugos de frutas se ha utilizado la cromatografía de ión-exclusión usando una columna a base de una resina sulfonada (Chinnici, Spinabelli, Riponi, & Amati, 2005). La cromatografía de ión-exclusión implica la separación de

diferentes especies usando una columna de intercambio iónico, los aniones de la muestra se excluyen de la fase de la resina mediante las cargas fijas de los grupos sulfonados ($-\text{SO}_3^-$) o grupos mixtos de sulfonados y carboxilados de la resina de intercambio catiónico (Fritz, 1991).

2. Estado del Arte

2.1 Hidrólisis de azúcares usando resinas de intercambio iónico

En diversos estudios se han realizado hidrólisis de azúcares, di- y polisacáridos provenientes de subproductos agrícolas, para ello se han utilizado diferentes resinas de intercambio iónico como catalizadores, como se resume en la tabla 1.

Tabla 1.

Condiciones de hidrólisis encontradas en la literatura usando diversas resinas de intercambio iónico.

Autor	Resina	Técnica, mensurando	R/S (p/p)	Condiciones	Conversión (%)
(Adnadjevic & Jovanovic, 2012)	Amberlite IR 120 H	DNS, sacarosa	2,6	170 °C, 1 h	85-100
(Plazl, Leskovšek, & Koloini, 1995)	Amberlite 200C	HPLC, sacarosa	1,6	80 °C, 3h	100

Autor	Resina	Técnica, mensurando	R/S (p/p)	Condiciones	Conversión (%)
(Zajšek & Goršek, 2010)	Amberlite IR 120 H	Real-time FTIR, sacarosa	3,6	79 °C, 1,5 h	100
Marzo, Gervasini, & Carniti, 2012)	Amberlite A120	HPLC, sacarosa	-	80 °C, 4 h	91
(Takagaki, Tagusagawa, & Domen, 2008)	Amberlyst 15	HPLC, sacarosa	0,2	80 °C, 2h	75
(Dhepe et al., 2005)	Amberlyst 15	HPLC, sacarosa	0,5	80 °C, 4h	88
(Kim et al., 2005)	Amberlyst 35W	HPLC, celobiosa	166	110-130 °C, 2h	80-100
(Kitano et al., 2009)	Amberlyst 15	Celobiosa	0,8	90 °C, 24 h	62
(Xu et al., 2008)	Dowex50 x2 100	SEC, maltose	0,5	120 °C, 26 h	95

R/S: Relación resina-sustrato

A partir de la información tabulada en la tabla 1 se puede concluir que las reacciones de hidrólisis se llevan a cabo usando relaciones resina: sacarosa de 0,2 a 166; temperatura entre 80 y 120°C y tiempos de reacción entre 1 y 24 horas.

Algunos trabajos de hidrólisis sobre la sacarosa se han enfocado en el tamaño de partícula de una resina de intercambio iónico y la concentración de sacarosa, encontrándose además que el calentamiento por microondas acelera significativamente la velocidad de las reacciones químicas y los procesos físico-químicos, alcanzando mayores rendimientos. Por ejemplo, las velocidades de hidrólisis isotérmica heterogénea de sacarosa usando resina de intercambio iónico Amberlite IR-120H incrementan entre 5-7 veces cuando se emplea el calentamiento por microondas, (Adnadjevic & Jovanovic, 2012).

La hidrólisis de sacarosa, maltosa y celobiosa, se ha realizado en condiciones suaves (50-80 °C) usando resinas ácidas (Amberlite A120 y A200) como catalizadores ácidos sólidos en un

reactor continuo, alcanzando una conversión completa de sacarosa a una temperatura de trabajo de 80°C y buenos valores de conversión para celobiosa y maltosa (Marzo et al., 2012).

Desde el punto de vista de la química verde, en los procesos de hidrólisis es de vital importancia el uso de catalizadores heterogéneos que trabajen en un medio acuoso. La catálisis heterogénea para la hidrólisis de celulosa tiene ciertas ventajas respecto a las homogéneas por su fácil separación y reutilización.

2.2 Método para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa en alimentos

Filip et al. (2016) desarrollaron un método de HPLC-RI para la determinación simultánea de glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol en muestras de cáscara de manzana, usando una columna Carbosep Coregel 87H3. Con un límite de detección de 2,67- 4,83 µg/mL. El método fue validado por una linealidad $R^2 > 0.99$ (Filip, Vlassa, Coman, & Halmagyi, 2016).

Murillo et al. (2016) han desarrollado un método de HPLC preciso y exacto con el cual se pueden determinar sacáridos como sacarosa, glucosa y fructosa en mieles, con un límite de detección de 0,05 mg/mL. El método fue comprobado usando cuatro parámetros de desempeño y un coeficientes de variación $< 5\%$ (Murillo, Villamizar, Pico, Jaimes, & López, 2016).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Establecer las condiciones de hidrólisis de residuos de mucílago del material de cacao CCN-51 para generar jarabes con una mayor concentración glucosa y fructosa.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la influencia de las variables del proceso (relación sustrato:catalizador y temperatura) sobre la conversión de sacarosa presente en el mucílago de cacao CCN-51, en azúcares simples (glucosa, fructosa), usando como catalizador una resina de intercambio iónico Amberlite IR 120.
- Determinar la influencia de la temperatura y el tiempo como variables de la hidrólisis no catalítica de la sacarosa presente en el mucílago de cacao CCN-51.
- Determinar el efecto de la reactivación de la resina de intercambio iónico sobre la actividad catalítica de hidrólisis de la sacarosa presente en el mucílago de cacao CCN-51.

4. Materiales y Metodología

4.1 Reactivos y muestras

Los reactivos glucosa, fructosa y sacarosa fueron marca Merck. El agua que se usó en el procedimiento fue ultra-pura ($0,056 \mu\text{S}/\text{cm}$) para HPLC, obtenida del equipo Aqua Solutions® modelo 2122A ubicado en el laboratorio de alimentos CICTA. Las muestras de mucílago de cacao fueron del material CCN-51 plantado en la finca Nápoles en el municipio de Lebrija.

4.2 Características del equipo y columna usada para la cuantificación de azúcares

El equipo que se usó para llevar a cabo el análisis fue un cromatógrafo líquido HPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 equipado con desgasificador, inyector automático, una columna ICE COREGEL 107-H (Transgenomic) un detector RI RefractoMax520. Los demás parámetros del equipo y de la columna se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.

Parámetros del equipo de HPLC para el análisis de azúcares

Parámetros	Especificaciones
Columna	COREGEL 107-H 7,8 x 300 mm (8 µm)
Temperatura de la columna	30 °C
Temperatura del detector RI	30 °C
Volumen de inyección	20 µL
Flujo	0,6 mL/min
Fase móvil	Isocrático; 0,005 M de H ₂ SO ₄

4.3 Realización de la curva de calibración

Inicialmente se prepararon las soluciones patrón de sacarosa, glucosa y fructosa, pesando el reactivo en la balanza y diluyendo en agua tipo 1. Las soluciones preparadas para realizar las curvas de calibración fueron las siguientes:

Tabla 3.

Soluciones patrón de azúcares

Concentración			
Patrones	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
1	1 mg/mL	0 mg/mL	1 mg/mL
2	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL
3	5 mg/mL	5 mg/mL	5 mg/mL
4	10 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL
5	15 mg/mL	15 mg/mL	15 mg/mL
6	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL

4.4 Preparación de las muestras

El mucílago se retiró del grano usando un desmucilagador manual. Seguidamente se homogeneizó empleando una licuadora; el jugo obtenido se filtró para eliminar los sólidos en suspensión, después se pasteurizó a 75°C por 5 minutos.

Una vez esterilizado se procedió a determinar las concentraciones de azúcares siguiendo el procedimiento descrito por Murillo et al. (2016). Brevemente, se disolvieron, a 23 °C, aproximadamente 2 g mucílago filtrado en 10 mL de agua tipo 1, y la mezcla se agitó por 2 minutos y se centrifugó a 4000 rpm, seguidamente una parte de la solución se pasó por un filtro de jeringa de 0,45 µm y membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se inyectaron 20 µL

del filtrado al equipo de HPLC. Los azúcares se identificaron y cuantificaron con el detector RI, de acuerdo con los tiempos de retención de estándares inyectados previamente. Finalmente, la concentración individual de los azúcares (sacarosa, glucos y fructosa) se calculó utilizando la curva de calibración de cada patrón.

4.5 Caracterización físico-química del mucílago filtrado

Al mucílago filtrado se le determinaron las siguientes propiedades físico-químicas: acidez titulable (AOAC 942.15), pH (AOAC 970.21), proteína (AOAC 970.22), ácido cítrico (AOAC 986.13), humedad (AOAC 931.04) y cenizas (AOAC 972.15). La acidez titulable se determinó usando una solución de NaOH 0,1 N y fenolftaleína como indicador.

La determinación individual de azúcares antes y después de la pasteurización se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4.

4.6 Hidrólisis catalítica del mucílago filtrado

La hidrólisis se llevó a cabo usando, como catalizador, una resina de intercambio iónico de tipo Amberlite IR 120. El efecto de las variables temperatura y relación resina:sacarosa sobre la conversión de sacarosa se evaluaron teniendo en cuenta trabajos previos como el de Zajsek et al.

(2010) y un experimento preliminar, en el cual se hidrolizó la sacarosa presente en el mucílago filtrado a una temperatura de 80 °C y relación resina sacarosa de 3,6, el tiempo en el cual la reacción alcanzó un estado estable fue de una hora, la agitación de la resina dentro del reactor se realizó con un shaker Heidolph vibramax 1000 (Zajšek & Goršek, 2010). Esto se hizo inicialmente, con el fin de tener un punto de referencia para la hidrólisis de sacarosa presente en mucílagos filtrados, debido a que en la literatura no hay reportes al respecto, los reportes de la literatura mencionan la hidrólisis de sacarosa pura.

Lo anterior se llevará a cabo con base en un diseño de superficie de respuesta: compuesto central rotatable 2^2 más puntos centrales con 3 réplicas, donde se usaran como variables temperatura y relación resina:sacarosa, los niveles máximos y mínimos usados en el diseño experimental se indican en la tabla 4. El software utilizado fue STATISTICA versión 10 para Windows.

La conversión de la sacarosa después de cada proceso de hidrólisis se calculó a partir de la ecuación:

$$\alpha = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Donde C_f es la concentración de sacarosa en el tiempo de reacción y C_i es el valor inicial de sacarosa (Adnadjevic & Jovanovic, 2012).

Los datos obtenidos fueron tratados con un análisis de varianza (ANOVA) a una sola vía, usando el programa STATISTICA versión 10 de prueba para Windows, y así determinar si las variables a evaluar en las hidrólisis tienen algún efecto estadísticamente significativo sobre el proceso.

Para determinar cuáles términos contribuyen más a la variabilidad de la conversión de sacarosa se usó el diagrama de Pareto, en el cual se comparó la magnitud relativa y la significancia estadística de cada uno de los efectos. El diagrama fue construido con los valores absolutos de los efectos estandarizados, con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 4

Valores máximos y mínimos del diseño experimental de hidrólisis catalítica

Niveles	Temperatura (°C)	Relación resina:sacarosa (p/p)
-1	70	3,2
+1	80	3,6

4.7 Hidrólisis no catalítica del mucílago filtrado

En la hidrólisis no catalítica se evaluó en el efecto del tiempo del tiempo y la temperatura sobre la conversión de sacarosa, para ello se utilizaron las condiciones de temperatura de Sepúlveda y colaboradores en la hidrólisis no catalítica de sacarosa presente en residuos de piña, una temperatura entre 150 - 175 °C (Sepúlveda, Romaní, Aguilar, & Teixeira, 2018). Teniendo en cuenta que para la hidrólisis no catalítica de sacarosa en mucílagos filtrados, no hay reportes al respecto en la literatura, se mencionan hidrólisis de otros subproductos industriales.

Lo anterior se llevará a cabo con base en un diseño de superficie de respuesta: compuesto central rotatable 2^2 más puntos centrales con 2 réplicas, donde se usaron como variables

temperatura y tiempo los niveles máximos y mínimos usados en el diseño experimental se indican en la tabla 5. El software utilizado fue STATISTICA versión 10 para Windows.

Tabla 5.

Valores máximos y mínimos del diseño experimental de hidrólisis no catalítica

Niveles	Temperatura °C	Tiempo (min)
-1	150	5
+1	175	10

4.8 Reutilización del catalizador

El rendimiento de la resina fue analizado usándose de nuevo en hidrólisis sucesivas bajo las condiciones determinadas en el numeral 4.6 este proceso se llevó a cabo por triplicado.

Entre cada uso del catalizador se realizó una activación de la resina manteniéndola en una solución de 500 mL de HCl 2 M durante 5 min, seguidamente se lavó con agua destilada con el fin de eliminar trazas de HCl y azúcares restantes atrapados en las matrices de las resina (Zajšek & Goršek, 2010). Para calcular la eficiencia del catalizador se tuvo en cuenta la conversión de sacarosa como se muestra en el numeral 4.6, comparando los valores de los experimento 8.

5. Resultados

5.1 Análisis de la curva de calibración

En la tabla 6 se tabulan los tiempos de retención de la sacarosa, glucosa y fructosa; los cuales fueron determinados a partir de 5 inyecciones individuales para cada uno de los estándares.

Tabla 6

Tiempo de retención de sacarosa, glucosa y fructosa

Mensurando	t_r (min)
Sacarosa	$5,96 \pm 0,04$
Glucosa	$7,22 \pm 0,01$
Fructosa	$7,87 \pm 0,02$

t_r : tiempo de retención

Para cada curva se calculó la ecuación de la recta y el valor de R^2 como se muestra en la tabla 7. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede apreciar que cada uno de los mensurandos presentó un comportamiento lineal; los valores de R^2 son mayores a 0,999. De acuerdo con lo anterior el método se comporta de forma lineal dentro del intervalo de 1 – 20 mg/mL.

Tabla 7.

Características de las curvas de calibración

Mensurando	Ecuación de la recta	Valor R²	Intervalo
Sacarosa	$y = 2,7935x - 0,1455$	$R^2 = 0,9993$	1 – 20 mg/mL
Glucosa	$y = 2,8829x - 0,6393$	$R^2 = 0,9993$	1 – 20 mg/mL
Fructosa	$y = 2,9917x - 0,8361$	$R^2 = 0,9989$	1 – 20 mg/mL

y: concentración en mg/L; x: área.

5.2 Caracterización fisicoquímica del mucílago filtrado.

Los resultados del análisis bromatológico mostrado en la tabla 8, se compararon con el trabajo realizado por Vera et al. (2013) para la caracterización bromatológica de un cacao CCN-51, de acuerdo con la tabla, los valores encontrados en este trabajo son similares a los previamente reportados por Vera et al. (2013). Después del proceso de pasteurización no se observan cambios significativos entre los diferentes parámetros, sólo un leve descenso en las concentraciones de azúcares por las reacciones de Maillard en el proceso de pasteurización.

Tabla 8.

Resultados del análisis bromatológico

Parámetro	Antes de pasteurización	Después de pasteurización	(Vera, 2013)
Acidez titulable (%ácido cítrico)	0,83 ± 0,06	0,87 ± 0,04	1,05 ± 0,05
pH	3,42 ± 0,07	3,35 ± 0,08	3,25 ± 0,08
Proteína (g/100g)	0,50 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,28 ± 0,01
Humedad (g/100g)	-	82,75 ± 0,01	84,20 ± 3,53
Cenizas (g/100g)	-	0,20 ± 0,03	1,50 ± 0,06
Sacarosa (g/100g)	6,34 ± 0,20	6,31 ± 0,06	6,15 ± 0,06
Glucosa (g/100g)	6,49 ± 0,14	6,28 ± 0,09	4,67 ± 0,05
Fructosa (g/100g)	6,51 ± 0,10-	6,46 ± 0,06	5,08 ± 0,08
°Brix	17,4 ± 1,0	17,5 ± 1,3	16,8 ± 1,1

5.3 Hidrólisis catalítica del mucílago filtrado

Las concentraciones obtenidas de los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) después de la hidrólisis catalítica del mucílago filtrado de cacao se muestran en la Tabla 9. La mayor conversión de sacarosa (86%) se alcanzó bajo las condiciones del experimento 8 ver figura 5, sin embargo todos los experimentos alcanzaron conversiones por encima del 50%.

Tabla 9.

Resultados hidrólisis catalítica de sacarosa

Exp	Variables independientes		Variables de respuesta		
	Temperatura (°C)	R:S (p/p)	Sacarosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Fructosa (g/100g)
I	NA	NA	6,31 ± 0,06	6,46 ± 0,09	8,27 ± 0,06
1	68	3,4	2,93 ± 0,07	7,41 ± 0,17	8,94 ± 0,39
2	70	3,2	2,13 ± 0,03	7,67 ± 0,16	9,65 ± 0,45
3	70	3,6	2,10 ± 0,04	7,91 ± 0,13	9,83 ± 0,11
4	75	3,1	1,37 ± 0,07	8,09 ± 0,16	10,69 ± 0,12
5	75	3,7	1,26 ± 0,07	7,99 ± 0,08	10,66 ± 0,16
6	80	3,6	2,20 ± 0,06	7,98 ± 0,22	9,95 ± 0,13
7	80	3,2	2,20 ± 0,11	7,96 ± 0,08	9,86 ± 0,18
8	82	3,4	0,88 ± 0,02	8,00 ± 0,08	10,80 ± 0,61

NA: no aplica, R:S: relación resina sacarosa

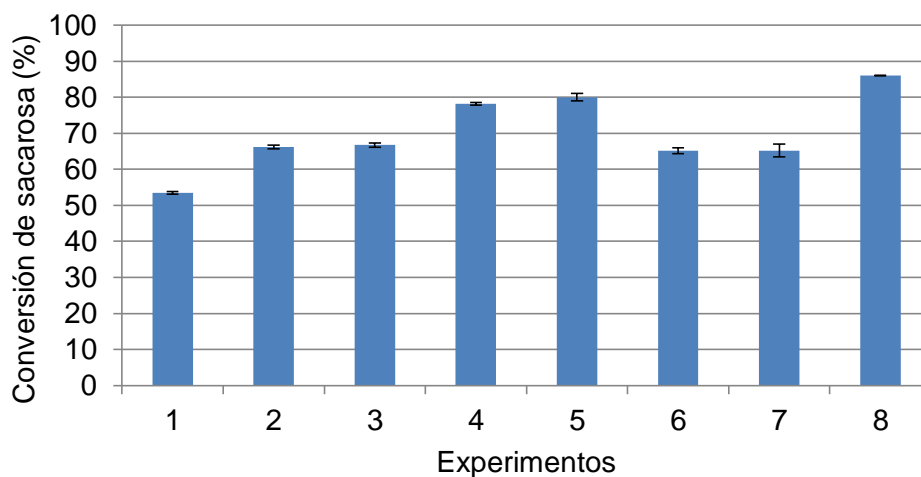


Figura 5. Conversión de la sacarosa en la hidrólisis catalítica

Las cantidades de glucosa y fructosa obtenidas después de la hidrólisis no son equimolares; lo anterior puede explicarse si se considera que tal vez se produjeron reacciones de Maillard debido al pH ácido y a las sustancias nitrogenadas (aminoácidos, polipéptidos y proteínas) presentes en los filtrados del mucílago; estas pudieron reaccionar con los azúcares reductores (glucosa y fructosa) en diferentes proporciones explicando así las diferencias en concentración obtenidas. Otra posible razón por la cual no se obtienen cantidades equimolares de glucosa y fructosa es que a pH ácido, durante la hidrólisis de sacarosa, puede darse la transposición de Bruyn-van Ekenstein en la cual una aldosa (glucosa) se puede convertir en una cetosa (fructosa) y viceversa (Miljkovic, 2009).

El efecto de las modificaciones en la relación resina:sacarosa y temperatura fueron evaluados usando un diagrama de Pareto. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 6 se puede

concluir que las variables temperatura y relación resina:sacarosa tienen una incidencia significativa sobre la variable de respuesta dentro de un nivel de confianza del 95%.

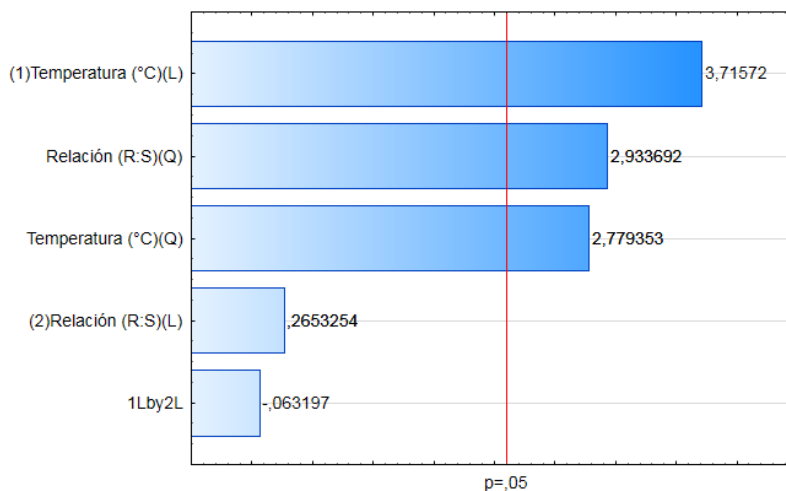


Figura 6. Diagrama de Pareto para efectos en hidrólisis catalítica

La Figura 6 muestra el efecto estandarizado de cada variable en la hidrólisis catalítica de sacarosa. Las barras que pasan la línea vertical corresponden a los efectos estadísticamente significativos, con un nivel de confianza del 95%.

El efecto de la temperatura (°C) y la relación resina:sacarosa (p/p) en la hidrólisis catalítica se muestra en la Figura 7. Como se observó, a valores altos de temperatura y una relación resina:sacarosa cercana a 3,4, se tiene una mayor conversión de sacarosa se obtuvo una conversión del 86% de sacarosa, la conversión de sacarosa no alcanza un 100% como en el trabajo de Zajsek et al. (2013) porque a diferencia de éste, la hidrólisis se realiza con un mucílago el cual está compuesto por una variedad de productos como compuestos nitrogenados, ácido láctico, acético y cítrico que reducen la cantidad de sacarosa hidrolizada.

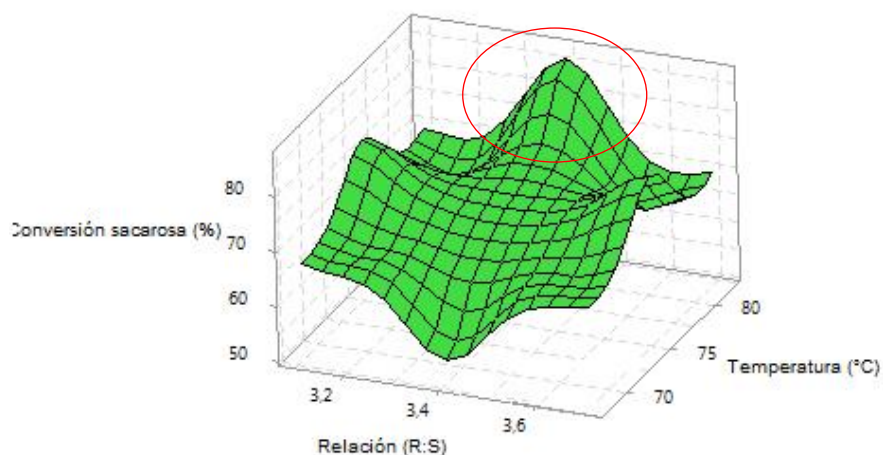


Figura 7. Superficie de respuesta del efecto de la temperatura (°C) y relación resina: sacarosa (R:S) sobre la hidrólisis catalítica

5.4 Hidrólisis no catalítica de mucílago filtrado

Los azúcares obtenidos (sacarosa, glucosa y fructosa) y las respectivas concentraciones después de la hidrólisis no catalítica del mucílago filtrado se muestran en la Tabla 10. La mayor conversión de sacarosa fue del 57%, la cual se alcanzó bajo las condiciones del experimento 1 como lo expresa la Figura 8.

Tabla 10.

Resultados hidrólisis no catalítica

Exp	Variables independientes		Variables de respuesta		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Sacarosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Fructosa (g/100g)
I	NA ^a	NA	6,92 ± 0,81	6,39 ± 0,12	8,72 ± 0,04
1	175	15	2,71 ± 0,06	8,44 ± 0,50	10,98 ± 1,06
2	175	5	6,21 ± 1,26	6,25 ± 0,14	8,83 ± 0,65
3	150	5	6,44 ± 0,98	6,79 ± 0,14	8,74 ± 0,06
4	150	15	4,59 ± 0,71	7,33 ± 0,39	9,60 ± 0,09
5	145	10	5,84 ± 1,44	6,74 ± 1,05	8,86 ± 0,35
6	180	10	4,06 ± 1,02	7,35 ± 0,85	10,08 ± 0,84
7	163	17	3,92 ± 0,33	7,85 ± 0,48	10,31 ± 1,10
8	163	3	6,70 ± 0,25	6,77 ± 0,36	8,33 ± 0,01

^aNA: no aplica

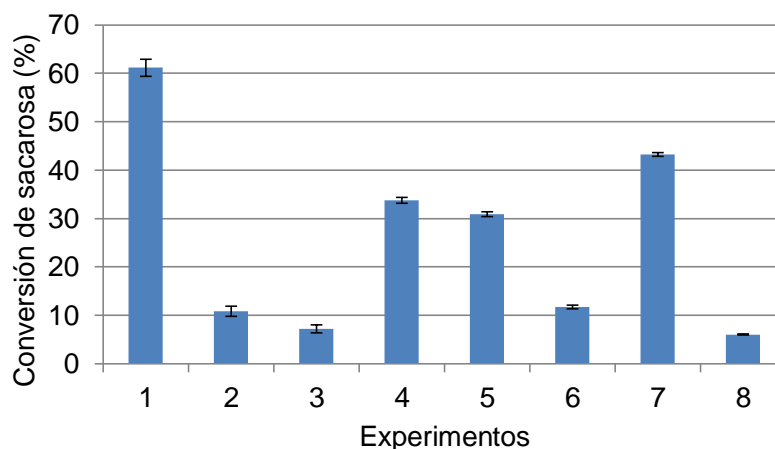


Figura 8. Rendimiento de la sacarosa en la hidrólisis no catalítica

En la hidrólisis no catalítica al trabajar a temperaturas por encima de los 100 °C, hay una evaporación de agua pero esto no genera un cambio en las cantidades de de glucosa y sacarosa. Al igual que en la hidrólisis catalítica, las cantidades de glucosa y fructosa después de los procesos hidrolítico no son equimolares; luego es razonable pensar que las explicaciones dadas con anterioridad también aplican para este caso.

Para la hidrólisis no catalítica también se evaluaron los efectos de las variables temperatura (°C) y tiempo (min) y las interacciones entre sí, aplicando un análisis de varianza ANOVA (ANEXO 3), de acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 9) se concluye que la temperatura es la única variable que tiene un efecto significativo sobre la variable de respuesta a un nivel de confianza del 95%.

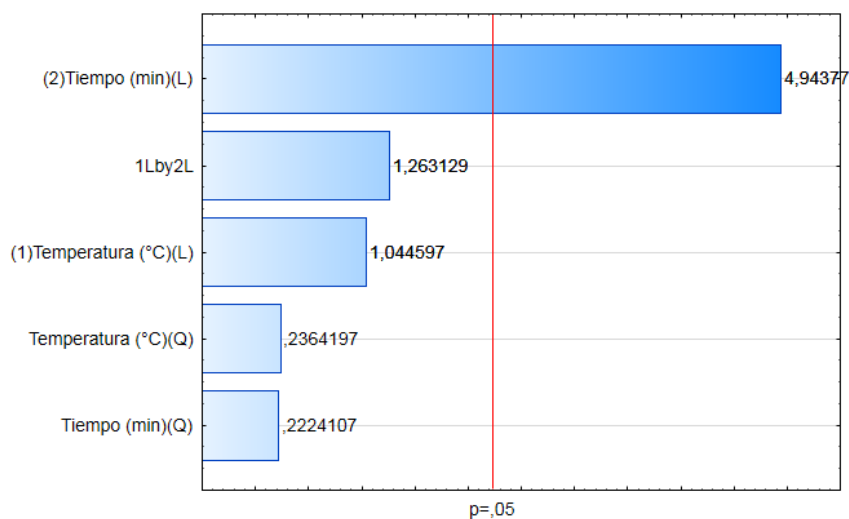


Figura 9. Diagrama de Pareto para efectos en hidrólisis no catalítica

Sepúlveda y colaboradores realizaron una hidrólisis no catalítica de residuos de piña a temperaturas de hasta 200 °C, concluyendo que la temperatura y el tiempo tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la hidrólisis no catalítica de sacarosa en residuos de piña. En este caso la temperatura no juega un efecto significativo debido a que en los residuos de piña no sólo hidrolizan sacarosa sino otros polisacáridos en los cuales es importante la temperatura de trabajo ya que de ella dependen procesos como la despolimerización de hemicelulosa y degradación de la lignina presente en los residuos de piña (A. Ruiz et al., 2013).

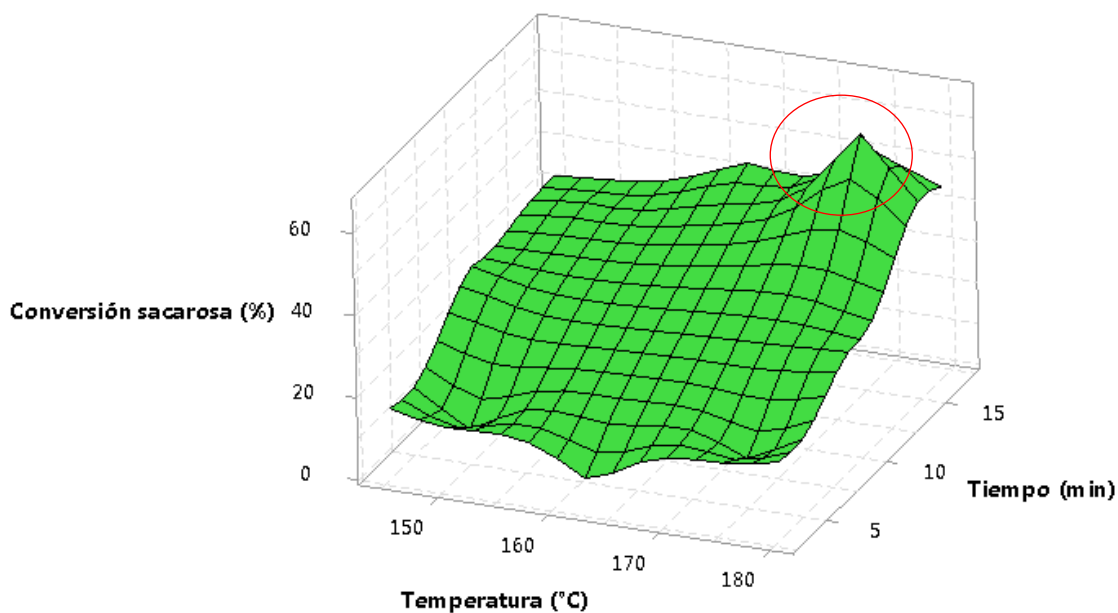


Figura 10. Superficie de respuesta del efecto de la temperatura (°C) y el tiempo (min) sobre la hidrólisis no catalítica

El efecto de la temperatura (°C) y el tiempo en la hidrólisis no catalítica se muestra en la figura 10. Como se observó a valores altos de temperatura y un mayor tiempo, se obtuvo una conversión del 57% de sacarosa.

5.5 Reutilización del catalizador

En la figura 11 se puede observar que después de reutilizar el catalizador en tres hidrólisis sucesivas no se evidenció una disminución en el porcentaje de conversión de sacarosa,

realizando un análisis de Tukey con un 95% de confianza no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes hidrólisis, lo que indica que la resina Amberlite IR 120H tiene una buena estabilidad después de la hidrólisis.

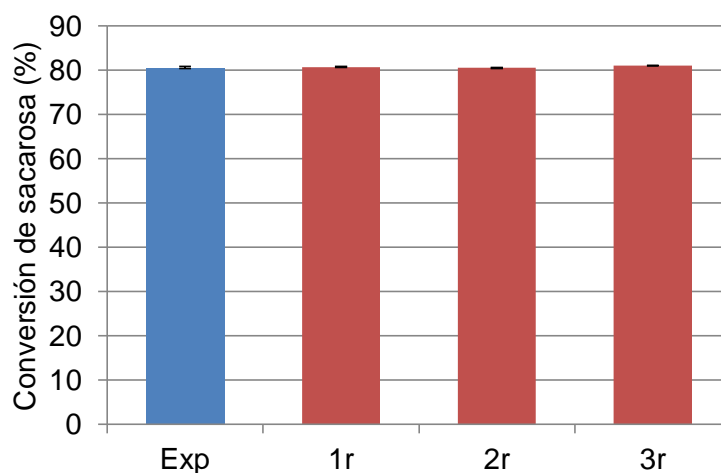


Figura 11. Rendimiento de la sacarosa durante la reutilización del catalizador

Huang y colaboradores han reportado previamente que no se ha realizado ningún informe de la reciclabilidad de un catalizador de resina para una reacción de hidrólisis de disacárido, pero que las resinas con grupos sulfonados pueden ser estables a baja temperatura (Huang & Fu, 2013). En nuestro caso particular trabajando a temperaturas que alcanzaron los 82 °C no se observó una disminución en la conversión de la sacarosa.

6. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, las mejores condiciones para llevar a cabo la hidrólisis catalítica del mucílago filtrado de cacao, fueron una temperatura de 82 °C y una relación resina:sacarosa de 3,4 (p/p); con estos valores se alcanza una conversión de sacarosa del 86%. Así mismo, los resultados del análisis estadístico confirmaron que la temperatura y el tiempo tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la conversión de sacarosa.

En la hidrólisis no catalítica se encontró que el tiempo es la única variable que tiene un efecto estadísticamente significativo, descartándose la temperatura. La mayor conversión de sacarosa se alcanza a una temperatura de 175 °C y un tiempo de 15 minutos.

En el proceso de hidrólisis de sacarosa, el uso de la resina Amberlite IR 120H como catalizador presenta determinadas ventajas sobre el proceso no catalítico, como el trabajo a bajas temperaturas y un mayor porcentaje de conversión. Teniendo en cuenta que el catalizador es fácil de retirar de la solución y regenerarse.

Los resultados de la reutilización de la resina, luego de 3 hidrólisis sucesivas, confirman que entre las ventajas de su uso se encuentran: su estabilidad y su capacidad a ser reactivados sin pérdida de actividad.

Bibliografía

- Adams, M. R., Dougan, J., Glossop, E. J., Twiddy, D. R., & Britain, G. (n.d.). Agricultural Wastes 4 (L982) 225-229, 4, 225–229.
- Adnadjevic, B. K., & Jovanovic, J. D. (2012). A comparative kinetics study on the isothermal heterogeneous acid-catalyzed hydrolysis of sucrose under conventional and microwave heating. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 356, 70–77. <http://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.12.027>
- Adu, M. O., Cobbinah, T., Asare, P. A., Yawson, D. O., & Taah, K. J. (2017). Demucilaging Freshly Stored Seeds of Cocoa (*Theobroma cacao* L .) Improves Seedling Emergence and Growth, 2017.
- Agronet. (2018). Área, producción y rendimiento nacional por cultivo. Retrieved September 24, 2018, from <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Balia, G., Grosso, M., Tronci, S., & Desogus, F. (2017). Microwave effects on the enzymatic hydrolysis of sucrose. *Chemical Engineering Transactions*, 57(1930), 1783–1788. <http://doi.org/10.3303/CET1757298>
- Bélanger, J. M. R., Jocelyn Paré, J. R., & Sigouin, M. (1997). Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. In J. R. J. Paré & J. M. R. B. T.-T. and I. in A. C. Bélanger (Eds.), *Instrumental Methods in Food Analysis* (Vol. 18, pp. 37–59). Elsevier. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80011-X](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80011-X)
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=xteiARU46SQC>
- Bennett, A. B. (2003). Out of the Amazon : *Theobroma cacao* enters the genomic era, 8(12), 561–563.
- Chakraborty, M., Deb, B., Dey, B., Hussain, S. A., Maiti, D. K., & Majumdar, S. (2017). Amberlite IR 120H⁺ Catalyzed N-C/C-N Coupled Cyclization Strategy to Give Imidazoles: Design and Fabrication of Organic Nanomaterial with AFM Imaging. *ChemistrySelect*, 2(1), 241–245. <http://doi.org/10.1002/slct.201601596>
- Chem, C. S. U. S. (2014). Hydrolysis of Oligosaccharides Over Solid Acid Catalysts : A Review, 1–11. <http://doi.org/10.1002/cssc.201300720>
- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., & Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal*

- of Food Composition and Analysis*, 18(2–3), 121–130.
<http://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.01.005>
- Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., & Carlos, J. (2011). LWT - Food Science and Technology Production of antioxidants by non-isothermal autohydrolysis of lignocellulosic wastes. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 436–442.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.006>
- Dhepe, P. L., Ohashi, M., Inagaki, S., Ichikawa, M., & Fukuoka, A. (2005). Hydrolysis of sugars catalyzed by water-tolerant sulfonated mesoporous silicas, 102(August), 163–169.
<http://doi.org/10.1007/s10562-005-5850-x>
- Filip, M., Vlassa, M., Coman, V., & Halmagyi, A. (2016). Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method. *Food Chemistry*, 199, 653–659.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.060>
- Fritz, J. S. (1991). Principles and applications of ion-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 546(C), 111–118. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93010-9](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93010-9)
- Hahn-Hägerdal, B., Skoog, K., & Mattiasson, B. (1983). The utilization of solid superacids for hydrolysis of glycosidic bonds in di- and polysaccharides: A model study on cellobiose, sucrose, and starch. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(6), 344–348. <http://doi.org/10.1007/BF00499501>
- Herrera, A. C. (2011). Estudio Comparativo De Métodos Para La Determinación De Sacarosa Y Azúcares Reductores En Miel Virgen De Caña Utilizados En El Ingenio Pichichí S.a, 52–56. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/2085>
- Herrmann, L., Felbinger, C., Haase, I., Rudolph, B., Biermann, B., & Fischer, M. (2015). Food fingerprinting: Characterization of the ecuadorean type CCN-51 of theobroma cacao L. Using microsatellite markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4539–4544. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01462>
- Huang, Y.-B., & Fu, Y. (2013). Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chemistry*. <http://doi.org/10.1039/c3gc40136g>
- Hurst, W. J., Martin, R. A., & Zoumas, B. L. (1979). Application of Hplc To Characterization of Individual Carbohydrates in Foods. *Journal of Food Science*, 44(3), 892–895.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08529.x>
- Johnson, R. K., Appel, L. J., Brands, M., Howard, B. V., Lefevre, M., Lustig, R. H., ... Wylie-Rosett, J. (2009). Dietary sugars intake and cardiovascular health a scientific statement from the american heart association. *Circulation*, 120(11), 1011–1020.
<http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192627>
- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N., & Ladisch, M. R. (2005). Plug-flow reactor for continuous hydrolysis of glucans and xylans from pretreated corn fiber. *Energy and Fuels*, 19(5), 2189–2200. <http://doi.org/10.1021/ef050106l>

- Kitano, M., Yamaguchi, D., Suganuma, S., Nakajima, K., Kato, H., Hayashi, S., & Hara, M. (2009). Adsorption-enhanced hydrolysis of β -1,4-glucan on graphene-based amorphous carbon bearing SO_3H , COOH , and OH groups. *Langmuir*, 25(9), 5068–5075. <http://doi.org/10.1021/la8040506>
- Marcilly, C. (2006). *Acido-basic catalysis: application to refining and petrochemistry*. Editions Technip. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=xMZTAAAAMAAJ>
- Martínez Montera, C., Rodríguez Doderó, M. C., Guillén Sánchez, D. a, & Barroso, C. G. (2004). Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review. *Chromatographia*, 59, 15–30. <http://doi.org/10.1365/s10337-003-0134-3>
- 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. *FRIN*, 49(1), 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Marzo, M., Gervasini, A., & Carniti, P. (2012). Hydrolysis of disaccharides over solid acid catalysts under green conditions. *Carbohydrate Research*, 347(1), 23–31. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.018>
- McMurry, J. (2007). *Organic Chemistry* (7th ed.). Cengage Learning. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=dlfYMYOZ4kwC>
- Miljkovic, M. (2009). *Carbohydrates: Synthesis, Mechanisms, and Stereoelectronic Effects*. Springer New York. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=gzzUta2WhxUC>
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: Concepts and Contrasts*.
- Moniz, P., Carvalheiro, F., & Duarte, L. C. (2016). *A Multipurpose Process for Biomass Upgrading*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00014-1>
- Murillo, C., Villamizar, A., Pico, S., Jaimes, J., & López, L. (2016). Implementación de un método analítico por cromatografía líquida para evaluar la calidad en mieles del nororiente colombiano, 25(40), 32–42.
- Oddoye, E. O. K., Agyente-Badu, C. K., & Gyedu-Akoto, E. (2013). Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. In R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Eds.), *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 23–37). Totowa, NJ: Humana Press. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_3
- Okuhara, T. (2002). Water-tolerant solid acid catalysts. *Chemical Reviews*, 102(10), 3641–3666. <http://doi.org/10.1021/cr0103569>
- Pallares, A. (2016). Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51 ., 21(1), 0–1.
- Parisi, S., & Luo, W. (2018). *Chemistry of Maillard Reactions in Processed Foods*. Springer

- International Publishing. Retrieved from
<https://books.google.com.co/books?id=GJtiDwAAQBAJ>
- Pito, D. S., Fonseca, I. M., Ramos, A. M., Vital, J., & Castanheiro, J. E. (2012). Hydrolysis of sucrose over composite catalysts. *Chemical Engineering Journal*, *184*, 347–351. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.033>
- Plazl, I., Leskovšek, S., & Koloini, T. (1995). Hydrolysis of sucrose by conventional and microwave heating in stirred tank reactor. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, *59*(3), 253–257. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-0467\(94\)02953-9](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-0467(94)02953-9)
- Quizhpi, E. (2016). *Caracterización Del Mucilago De Cacao Ccn 51 Mediante Espectrofotometría Uv-Visible Y Absorción Atómica. Caso: Ecuador-Zona 6*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25266/1/tesis.pdf>
- Ruiz, A., Rodri, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A., & Teixeira, A. (2013). Hydrothermal processing , as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review, *21*, 35–51. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.069>
- Ruiz, P. C. (2014). *Comparación del método HPLC y método de infrarrojos para la determinación de azúcares en la miel*.
- Santana, P. (2017). *Mucílago de cacao (Theobroma cacao L.), Nacional y Trinitario para la obtención de una bebida hidratante*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Sendra, E., Navarro, C., Sayas, E., Viuda-martos, M., Ferna, J., & Pe, A. (2009). Original article Storage stability of a high dietary fibre powder from orange, 748–756. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01892.x>
- Sepúlveda, L., Romani, A., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. (2018). Valorization of pineapple waste for the extraction of bioactive compounds and glycosides using autohydrolysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *47*(February 2017), 38–45. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.012>
- Takagaki, A., Tagusagawa, C., & Domen, K. (2008). Glucose production from saccharides using layered transition metal oxide and exfoliated nanosheets as a water-tolerant solid acid catalyst. *Chemical Communications*, (42), 5363–5365. <http://doi.org/10.1039/B810346A>
- Vera, E. (2013). Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, *26*(1), 8–15.
- Xu, C., Pranovich, A., Vähäsalo, L., Hemming, J., Holmbom, B., Schols, H. A., & Willför, S. (2008). Kinetics of acid hydrolysis of water-soluble spruce O-acetyl galactoglucomannans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(7), 2429–2435. <http://doi.org/10.1021/jf703702y>
- Yabushita, M. (2016). *A Study on Catalytic Conversion of Non-Food Biomass into Chemicals*.

<http://doi.org/10.1007/978-981-10-0332-5>

- Zajšek, K., & Goršek, A. (2010). A kinetic study of sucrose hydrolysis over Amberlite IR-120 as a heterogeneous catalyst using in situ FTIR spectroscopy. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 100(2), 265–276. <http://doi.org/10.1007/s11144-010-0154-6>
- Zhu, J., Gan, L., Li, B., & Yang, X. (2017). Synthesis and characteristics of lignin-derived solid acid catalysts for microcrystalline cellulose hydrolysis. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(1), 110–117. <http://doi.org/10.1007/s11814-016-0220-5>

Apéndices

Apéndice A. Resultados del análisis estadístico (Análisis de varianza ANOVA) de la hidrólisis catalítica.

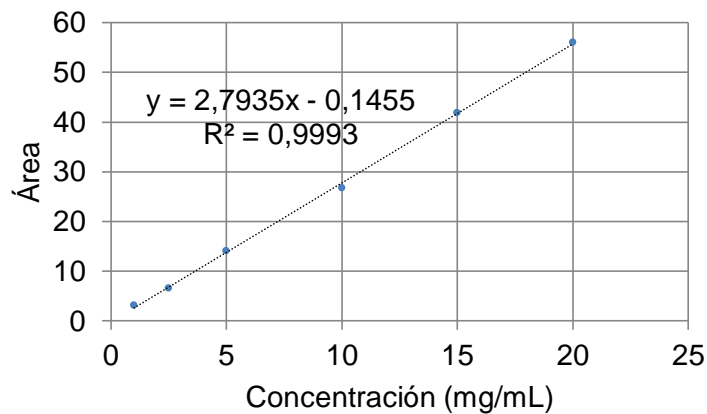
Factor	SC	GL	SMC	F	P
(1) Temperatura (°C)(L)	697,262	1	697,2623	13,80658	0,001582
Temperatura (°C)(Q)	390,119	1	390,1194	7,72480	0,012372
(2) Relación (R:S)(L)	3,555	1	3,5552	0,07040	0,793774
Relación (R:S)(Q)	434,650	1	434,6496	8,60655	0,008875
1L y 2L	0,202	1	0,2017	0,00399	0,950306
Error	909,039	18	50,5022		
Total SC	2316,580	23			

Apéndice B. Resultados del análisis estadístico (Análisis de varianza ANOVA) para la hidrólisis no catalítica

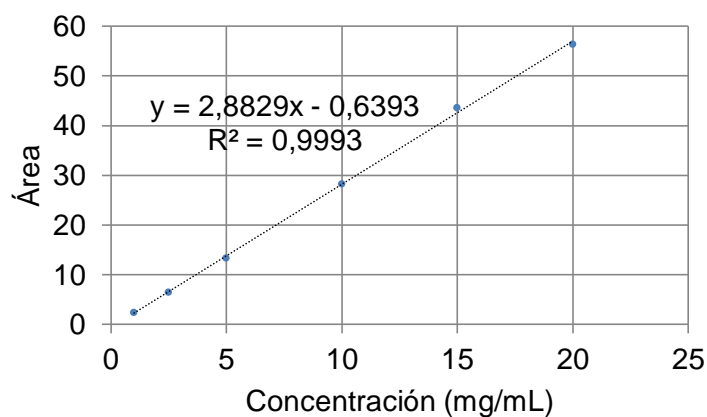
Factor	SC	GL	SMC	F	P
(1) Temperatura (°C)(L)	184,584	1	184,584	1,09118	0,320803
Temperatura (°C)(Q)	9,455	1	9,455	0,05589	0,817879
(2) Tiempo (min)(L)	4134,413	1	4134,413	24,44089	0,000584
Tiempo (min)(Q)	8,368	1	8,368	0,04947	0,828471
1L y 2L	269,893	1	269,893	1,59549	0,235199
Error	1691,597	10	169,160		
Total SC	6389,900	15			

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, SMC: suma media de cuadrados, F y P:
coeficientes de Fisher.

Apéndice C: Curvas de calibración del patrón de sacarosa



Apéndice D: Curvas de calibración del patrón de glucosa



Apéndice E. Curvas de calibración del patrón de fructosa

