

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ENZIMÁTICO – GRAVIMÉTRICO PARA
LA DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETARIA SOLUBLE E INSOLUBLE EN
RESIDUOS DE CACAO**

**LUZ MIRIAM FLÓREZ PARRA
MÓNICA JANNETH JEREZ MEZA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ENZIMÁTICO–GRAVIMÉTRICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETARIA SOLUBLE E INSOLUBLE EN
RESIDUOS DE CACAO**

**LUZ MIRIAM FLÓREZ PARRA
MÓNICA JANNETH JEREZ MEZA**

**Trabajo de Grado para optar al título de
Químico**

**Director
LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO
Ing. Químico, PhD química, bioquímica y ciencia de alimentos
Co-director
ARLEY RENÉ VILLAMIZAR JAIMES
Químico**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

DEDICATORIA

Este logro está dedicado especialmente a Dios, a María Santísima y a mis padres (Noralba y Celestino), que me han dado su apoyo a lo largo de este camino, con su esfuerzo, ayuda y dedicación he podido llegar hasta aquí, infinitamente agradecida con mis amigos (JSC, Diana, Gonzalo, Liliana, Karol, Alexa, Diego y Jorge) que más que amigos son esa pequeña familia que tienes fuera de casa, compañeros y muchos conocidos que pasaron durante esta época de universidad, que estuvieron junto a mí en los buenos y malos momentos, personas que siempre brindaron un granito de arena para tener la valentía y la fortaleza de continuar con la esperanza de cumplir este sueño.

Luz Miriam Flórez Parra

DEDICATORIA

En primer lugar a Dios por haberme permitido culminar con esta etapa de mi vida, por brindarme salud y todo lo necesario para salir adelante día a día sin desfallecer hasta poder lograr este objetivo.

A mi familia por toda su compañía, por no dejarme decaer en los momentos más difíciles, estar siempre presente en mis alegrías y tristezas, especialmente a mi mami Flor por su confianza y apoyo constante e incondicional en cada paso dado, por todos los valores que me ha inculcado para saber afrontar la vida y poder salir adelante con todo lo que me propongo y también a mis hermanos por su compañía y apoyo en mi camino de vida.

A mi novio Sergio por estar presente en la recta final de esta etapa, por su colaboración, apoyo y amor incondicional ha sido mi amigo y compañero inseparable, siempre brindándome calma y consejos en los momentos más necesarios.

A mis amigas; Susana, Natha y Diana, por brindarme su sincera amistad y su ayuda cuando la he necesitado.

A mi amiga y compañera de proyecto Miriam, por su ayuda para culminar satisfactoriamente el proyecto.

Monica Janneth Jerez Meza

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Laboratorio de alimentos CICTA, en especial a nuestro director de tesis el profesor Luis Javier López y al codirector Arley Villamizar Jaimes por permitirnos hacer parte del proyecto y del laboratorio, por brindarnos una muy buena orientación y apoyo en todo lo relacionado al proyecto. También agradecemos a los demás profesionales del laboratorio por compartir sus conocimientos y brindarnos su ayuda.

Por último y no menos importante a la profesora Luz Yolanda Vargas y al profesor Markus Doerr por brindarnos su orientación como calificadores, por el interés y la colaboración con nuestro proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1 OBJETIVOS	24
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2 MARCO TEÓRICO.....	25
2.1 RESEÑA HISTÓRICA	25
2.2 MARCO CONCEPTUAL.....	26
2.2.1 Cacao	26
2.2.1.1 Fruto	27
2.2.1.1.1 Clones	28
2.2.1.2 Residuos del cacao	29
2.2.1.2.1 Cáscara.....	29
2.2.1.2.2 Mucílago.....	30
2.2.2 Fibra alimentaria (FA) o Fibra dietaria (FD)	31
2.2.2.1 Fibra dietaria soluble (FDS o FS)	32
2.2.2.2 Fibra dietaria insoluble (FDI o FI)	33
2.2.2.3 Reglamentación para el consumo de fibra dietaría	33
2.2.2.4 Componentes de la Fibra dietaria.....	34
2.2.2.4.1 Celulosa	34
2.2.2.4.2 Hemicelulosa.....	34
2.2.2.4.3 Lignina.....	35
2.2.2.4.4 Pectinas	36

2.2.2.4.5	Mucílago	36
2.2.2.4.6	Gomas	37
2.2.2.5	Importancia de la Fibra Dietaria	39
2.2.3	Obtención y caracterización de la fibra dietaria	40
2.2.4	Fundamentación de las técnicas de análisis	41
2.2.4.1	Métodos de análisis de fibra dietaria	41
2.2.4.1.1	Método enzimático–gravimétrico para la determinación de fibra	44
2.2.4.1.1.1	α-amilasa Termoestable	45
2.2.4.1.1.2	Pepsina	46
2.2.4.1.1.3	Amiloglucosidasa	46
2.3	ESTADO DEL ARTE	47
2.3.1	Antecedentes determinación de fibra dietaria en residuos de cacao	47
3	PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1	MATERIALES Y REACTIVOS	52
3.1.1	Reactivos y solventes	52
3.1.2	Enzimas	52
3.1.3	Material de referencia certificado	52
3.1.4	Materia prima	53
3.2	EQUIPOS Y MATERIAL DE LABORATORIO	53
3.2.1	Material de laboratorio	53
3.2.2	Equipos	53
3.3	PROCEDIMIENTO	54
3.3.1	Recolección y acondicionamiento	54
3.3.2	Secado y molienda	55
3.3.3	Composición proximal de los residuos de cacao	56
3.3.4	Cuantificación de fibra dietaria (FDT, FDS y FDI)	56
3.3.4.1	Fibra dietaria total	57

3.3.4.1.1	Diagrama de la cuantificación de FDT	58
3.3.4.2	Fibra dietaria insoluble	60
3.3.4.3	Fibra dietaria soluble	60
3.3.4.4	Diagrama de la cuantificación de FDI y FDS	61
3.3.5	Determinación de humedad	62
3.3.6	Determinación de ceniza	63
3.3.7	Determinación de proteínas	63
3.3.8	Cálculo del contenido de fibra dietaria	65
3.4	PARÁMETROS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO	66
3.4.1	Precisión	66
3.4.2	Exactitud	67
3.4.3	Límite de Detección (LOD)	67
3.4.4	Límite de Cuantificación (LOQ)	68
3.5	FORMULACIÓN DE UN MATERIAL DE FIBRA DIETARIA	68
4	ANÁLISIS DE RESULTADOS	69
4.1	COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LAS HARINAS DE LOS RESIDUOS DE CACAO	69
4.2	DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS DE MÉRITO	70
4.2.1	Exactitud del método.	70
4.2.2	Determinación del límite de detección para la FDT (LOD)	71
4.2.3	Determinación del límite de cuantificación para la FDT (LOQ)	72
4.2.4	Determinación de la precisión del método	73
4.3	ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA FIBRA DIETARIA DE LOS CLONES ANALIZADOS.	80
4.4	ANÁLISIS DE LA RELACIÓN FDI:FDS EN RESIDUOS DE CACAO (CÁSCARAS Y MUCÍLAGOS)	84
4.5	OBTENCIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE FIBRA DIETARIA UTILIZANDO LOS RESIDUOS ESTUDIADOS	86

5	CONCLUSIONES.....	88
6	RECOMENDACIONES	89
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
	BIBLIOGRAFÍA	95
	ANEXOS.....	98

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Planta de cacao.	27
Figura 2. Mazorca de cacao a. Material sin abrir b. Material abierto.	27
Figura 3. Cáscara de cacao.....	29
Figura 4. Mucílago o pulpa de la semilla de cacao.....	30
Figura 5. Estructura molecular de la celulosa.	34
Figura 6. Estructura química de los componentes principales de la hemicelulosa.	35
Figura 7. Lignina.	35
Figura 8. Estructura de la pectina.....	36
Figura 9. Cadena de mucílago de la semilla de algarroba	37
Figura 10. Estructura de la goma agar	37
Figura 11. Hidrolisis de la α -amilasa termoestable	46
Figura 12. Hidrolisis de la amiloglucosidasa.....	46
Figura 13. a. Desmucilagador b. Mucílago obtenido.....	54
Figura 14. a. Cáscara seca. b. Harina de la cáscara.....	55
Figura 15. a. Unidad de digestión (BÜCHI 426). b. unidad de destilación (BÜCHI K-314).....	64

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Información morfo-agronómica del clon de cacao CCN-51 y TSH-565. ...	28
Tabla 2. Composición química de la fibra dietaria.	38
Tabla 3. Generalidades de los métodos gravimétricos para la determinación de fibra en alimentos, de acuerdo con la aproximación de análisis empleada.	42
Tabla 4. Subdivisión de los métodos enzimático–químico, según su técnica analítica de determinación.	43
Tabla 5. Estudios realizados a cacao por un método enzimático–gravimétrico. ...	48
Tabla 6. Estudios de determinación de fibra realizados a diferentes matrices por métodos enzimáticos–gravimétricos.	50
Tabla 7. Análisis bromatológico a las harinas de cáscara de cacao de cinco clones.	51
Tabla 8. Composición proximal de la harina de las cáscaras y mucílagos de cacao estudiados.	69
Tabla 9. Exactitud del método.	70
Tabla 10. LOD para el blanco, en el método enzimático-gravimétrico.	72
Tabla 11. LOQ para el blanco, en el método enzimático-gravimétrico.	73
Tabla 12. Precisión intermedia de los porcentajes de FDS, FDI y FDT (como la suma de la FDS+FDI) para el residuo de cáscara de los dos clones CCN-51 y TSH-565. (Cada analista realizo 5 ensayos con su respectivo duplicado).....	74
Tabla 13. Precisión intermedia de los porcentajes de FDS, FDI y FDT (como la suma de la FDS+FDI) para el residuo de mucílago de los dos clones CCN-51 y TSH-565. (Cada analista realizo 3 ensayos con su respectivo duplicado).....	75
Tabla 14. Repetibilidad del método analista 1.	76

Tabla 15. Repetibilidad del método analista 2.	77
Tabla 16. Datos del análisis ANOVA para los resultados de FDS, FDI y FDT por cada analista.	79
Tabla 17. Datos del análisis TUKEY para los resultados de FDS, FDI y FDT por cada analista.	80
Tabla 18. Cuadro comparativo de los % FDS, FDI y FDT por diferentes estudios realizados en cacao.	82
Tabla 19. Comparación de la FDT determinada para cada residuo, con la FDS+FDI para los clones de CCN-51 y TSH-565.	83
Tabla 20. Datos del análisis ANOVA para los resultados de FDT para cada clon.	84
Tabla 21. Contenido de FDS, FDI, FDT y la relación de FDI:FDS en los residuos de cacao analizados.	85

INDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Diferencias entre los % FDS, FDI y FDT, para la cáscara, por cada uno de los analistas.	78
Gráfica 2. Diferencias entre los % FDS, FDI y FDT, para el mucílago, por cada uno de los analistas.	79
Gráfica 3. Contenido de FDS, FDI y FDT en residuos de cacao.....	81

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Tabla T-student.	101
Anexo B. Resultados para la cáscara del TSH-565.	102
Anexo C. Resultados cáscara CCN-51.	103
Anexo D. Resultados mucílago CCN-51.	104
Anexo E. Resultados mucílago TSH-565.	105

RESUMEN

TÍTULO: Implementación de un método enzimático–gravimétrico para la determinación de fibra dietaria soluble e insoluble en residuos de cacao.

Autores: Flórez Parra, Luz Miriam**.
Jerez Meza, Mónica Janneth**.

PALABRAS CLAVES: Fibra dietaria, residuos de cacao, método enzimático-gravimétrico.

DESCRIPCIÓN:

Se busca destacar la importancia de la fibra en la alimentación humana y su obtención empleando residuos agroindustriales, tales como la cáscara y el mucílago de la mazorca de cacao; los cuales son desechos abundantes de la industria cacaotera.

El trabajo realizado consistió en la implementación de un método enzimático-gravimétrico para la determinación de fibra dietaria en residuos de cacao. Se emplearon métodos AOAC 985.29, 993.19 y 991.42, con algunas modificaciones, se realizó un acondicionamiento de la materia prima y la determinación de la fibra por medio de digestiones enzimáticas (α -amilasa, pepsina y amiloglucosidasa).

Se obtuvo el contenido de fibra dietaria total en un material de referencia certificado para así determinar la exactitud del método, se determinó el porcentaje de fibra dietaria total (FDT), fibra dietaria soluble y fibra dietaria insoluble (FDS, FDI) en la cáscara y el mucílago de los clones de cacao CCN-51 y TSH-565, los resultados permiten demostrar que el mucílago es una buena fuente de FDS (Entre 12,59 – 12,81 g/100g BS), mientras que la cáscara es buena fuente de FDI (Entre 48,40 – 52,43 g/100g BS). La precisión del método se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia de los porcentajes de fibra (%FDT, %FDI y %FDS), obteniéndose porcentajes de coeficiente de variación (CV) <5%.

Se realizó análisis estadístico ANOVA/TUKEY, para corroborar que los resultados obtenidos por el método implementado fueran válidos, coherentes y confiables, dando como resultados que el método es preciso y exacto, con un nivel de confianza del 95% donde el valor teórico para el material de referencia era de 14,50 y el valor obtenido de 14,92, con un porcentaje de error de 0,29 , lo cual permite la posterior implementación del método enzimático-gravimétrico para ser empleado en análisis de rutina, en el laboratorio de alimentos CICTA.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de química. Director: Luis Javier López Giraldo.

ABSTRACT

Title: Implementation of an enzymatic–gravimetric method for determination of the soluble and insoluble dietary fibers in cacao residues

Authors: Flórez Parra, Luz Miriam**.
Jerez Meza, Mónica Janneth**.

Keywords: Dietary fiber, cacao residues, enzymatic-gravimetric method.

Description:

We try to highlight the importance of the fiber in the human feeding and its derivation using agro-industrial residues, such as the peel and mucilage of cacao pods; which are abundant wastes in the cacao industry.

The carried out work was consisted in the implementation of an enzymatic-gravimetric method to calculate the dietary fiber in the cacao residues. AOAC methods 985.29, 993.19 and 991.42, were used with some modifications; a raw material fitting was done and we determined the amount of fiber through enzymatic digestions (α-amylase, pepsin and amyloglucosidase).

A certified material was used to obtain the total content of dietary fiber so we could determine the accuracy of the method, the percentage of the total dietary fiber was determined (TDF), soluble and insoluble dietary fiber (SDF, IDF) in the peel and mucilage of the cocoa clones CCN-51 and TSH-565. The results demonstrate the mucilage is a good source of FDS (from 12,59 to 12,81 g/100g BS), while the peel is a good source of FDI (from 48,40 to 52,43 g/100g BS). The accuracy of the method was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision of fiber percentages (%TDF, %IDF y %SDF), so we obtained percentages of coefficient variation (CV) <5%.

An ANOVA/TUKEY statistical analysis was done to corroborate the obtained results of the implemented method were valid, coherent and reliable, giving as a result the method is accurate and precise, with a confidence level of 95% where the theoretical value of the reference material was be 14.50, with a error percentage of 0,29 , its allowed and the further implementation of method enzymatic-gravimetric method to be used in the routine analysis, in the CICTA foods laboratory.

*Grade work

** Faculty of science, School of Chemistry. Director: Luis Javier López Giraldo.

INTRODUCCIÓN

La planta de cacao se originó en las selvas tropicales de América y después se extendió a las zonas ecuatoriales de África y Asia. Es una especie que necesita de humedad y calor pues siempre se encuentra en floración; por lo general crece de 6 a 12 metros de altura, su terreno debe ser rico en nitrógeno, magnesio y potasio. Su fruto tiene la forma de un calabacín alargado que se vuelve rojo o amarillo; en la mayoría de los casos se realizan 2 cosechas al año ^{1,2} .

Antropólogos han evidenciado y documentado el consumo de cacao hacia alrededor del año 1100 A.C., algunas culturas meso americanas lo usaban como moneda y bebida en rituales religiosos. Su uso ha ido evolucionando, existen una gran variedad de tipos de cacao y diferentes métodos de producción los cuales influyen en la calidad del mismo ³.

El cacao se utiliza principalmente para la producción de chocolate, siendo el continente africano el mayor productor con el 59% de la oferta mundial; el mercado es liderado por costa de Marfil con el 34% de la producción mundial ⁴, en América latina el tercer país productor de cacao es Colombia, luego de Brasil y Ecuador ⁵.

Los métodos de transformación de frutas generan una gran cantidad de subproductos y residuos, a los cuales se les debe buscar un adecuado aprovechamiento, siendo una solución que contribuye al desarrollo industrial sostenible de nuevos productos ⁶. En especial la industria alimentaria del cacao–chocolate genera anualmente una gran cantidad de subproductos que no son aprovechados y otros que se utilizan para alimentación animal y otros fines distintos ⁷.

El principal subproducto o residuo obtenido de la explotación comercial del cacao está constituido por cáscaras y placentas, seguido por semillas o granos y un tercer desecho de importancia, posiblemente no considerado como tal es el mucílago. Los anteriores residuos representan aproximadamente el 75% del fruto, se generan cerca de 10 toneladas de cáscara (peso fresco) por cada tonelada de grano seco, los cuales traen consigo serios problemas, al ser portadoras de microorganismos patógenos ⁸.

Existe un considerable interés por parte de la industria de alimentos en el aprovechamiento de estos residuos, recuperando de este tipo de biomasa productos útiles y diversos nutrientes ⁹. Estudios han evaluado el importante uso de la cáscara y el mucílago del cacao como materia de investigación por su contenido de fibra dietaria (FD).

Con el nombre de FD se agrupa a una serie de sustancias de origen vegetal, estas no digeribles por las enzimas propias del organismo humano. La fibra dietaria se clasifica en fibra dietaria insoluble (FDI) y fibra dietaria soluble (FDS) con base en sus propiedades físicas y su efecto fisiológico en el organismo ¹⁰.

La FDI es ocasionalmente fermentada y tiene un marcado efecto como laxante y regulador intestinal, mientras que la FDS se fermenta en alta proporción. Uno de sus principales beneficios es la disminución de colesterol y glucosa en sangre y desarrollo normal de la flora intestinal ¹¹.

Los alimentos funcionales representan una gama de alimentos que además de actuar como nutrientes, pueden afectar positivamente funciones biológicas específicas, mejorando el estado general de salud y/o reduciendo los riesgos de algunas enfermedades ⁹.

Durante las dos últimas décadas la fibra dietaria ha generado un gran interés, debido a que se ha demostrado que posee efectos preventivos contra determinadas enfermedades⁶. Las propiedades fisiológicas de la fibra dietaria determinan su importancia en el organismo humano y su requerimiento en la dieta humana ¹².

Además de los flavonoides, el cacao es rico en otros compuestos de gran interés nutricional como la FD, la cual tiene efectos benéficos para la salud humana. Su ingestión se ha relacionado con la prevención de ciertas patologías como diabetes, alto colesterol, cáncer de colon y desórdenes gastrointestinales, entre otros ⁹. La importancia de la fibra en los alimentos ha llevado al desarrollo de un mercado grande y potente para los productos e ingredientes ricos en fibra, en la actualidad hay una tendencia a buscar nuevas fuentes de fibra dietaria ¹³.

A finales de 1976, se comenzó con la tarea de intentar cuantificar los componentes presentes en la fibra dietaria. Prosky León, con la ayuda de otros científicos desarrollaron el método enzimático–gravimétrico, el cual adoptó tiempo después la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC) como el primer método oficial para el análisis de fibra dietaria total (FDT). Este método, posteriormente fue modificado para poder cuantificar la fracción soluble e insoluble (método AOAC 991.43) con la utilización de ácido. La relación entre FDI:FDS es importante para la dieta, por sus propiedades funcionales ¹⁴, la relación debe ser 3:1 para su uso como ingrediente en la elaboración de alimentos procesados para consumo humano ¹⁰.

El análisis de la fibra dietaria se ha estudiado usando diferentes métodos, tanto enzimáticos como gravimétricos. Así mismo, se han desarrollado diferentes ensayos por colorimetría, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC), para la determinación de las cantidades de FDS,

FDI y FDT que contienen los alimentos ⁵. Los métodos enzimáticos-gravimétricos son adecuados para este estudio, ya que son sencillos, económicos, rápidos, exactos y precisos; comparados a los otros métodos.

Los objetivos de este trabajo de pregrado, realizado en el Laboratorio de Alimentos–CICTA de la Universidad Industrial de Santander, fue implementar un método enzimático-gravimétrico para determinar la FDS, FDI y la FDT en residuos de cacao de los clones CCN-51 y TSH-565, los cuales son representativos de los materiales sembrados en la región.

Así mismo, se proyecta que el método implementado será ofertado a la comunidad en general, aumentando de esta manera la oferta de servicios del Laboratorio de Alimentos-CICTA, en *pro* del fortalecimiento del eje misional de la proyección social.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar un método enzimático–gravimétrico que permita caracterizar y cuantificar la fibra dietaria (FDS, FDI y FDT) presente en residuos de cacao (cáscara y mucílago) en los clones CCN-51 y TSH 565.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la exactitud del método enzimático–gravimétrico, determinando la cantidad de fibra dietaria total presente en un material de referencia.
- Verificar estadísticamente mediante el empleo de figuras de mérito, la validez del método implementado.
- Determinar la cantidad de fibra dietaria soluble, insoluble y total obtenida de los residuos de cacao.
- Proponer alternativas de uso de los residuos de cacao (cáscara y mucílago), según su perfil en fibra.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 RESEÑA HISTÓRICA

El cacao es una planta también llamada *Theobroma cacao L.*, es uno de los cultivos de mayor importancia en Colombia. La mayor parte de la producción actual la consume la industria del chocolate. Inicialmente el cacao era cultivado por los indígenas (principalmente Aztecas y Mayas en Centroamérica) y ellos le dieron el nombre de Cacahuatl considerándolo sagrado. Los principales países productores de cacao son los del este de África (Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún); otros países productores son: Indonesia, Malasia, Brasil, Colombia, Ecuador y República Dominicana ¹⁵.

Históricamente, Santander es el departamento con mayor participación en la producción de cacao en Colombia; para el año 2010 se estimó que Santander produjo el 30,06% de la producción nacional, la cual ascendió 68 987 toneladas ⁴.

El cultivo de la planta de *Theobroma cacao L.*, se produce en un bosque húmedo, esta condición de humedad en su ambiente permite que se genere una flora verde, que producirá una gran cantidad de residuos que facilitan la propagación de problemas fitosanitarios (enfermedades de las plantas)¹⁶. Estos residuos generalmente se acumulan en los cultivos, generando de esta forma grandes problemas ambientales, convirtiéndose en el sustrato idóneo para el acrecentamiento y la expansión de microorganismos ¹⁷. Debido a que la cáscara de cacao está compuesta de gran cantidad de celulosa, ésta tiene una degradación demasiado lenta; requiriéndose la adición de productos que contengan nitrógeno, para permitir una rápida descomposición ^{2,18}.

Entre los desechos generados se destaca la cáscara, la cual es la directamente responsable de la propagación de diferentes microorganismos patógenos que son las causas principales de pérdidas económicas en la actividad cacaotera ¹⁹.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 **Cacao.** En el mercado, los granos de cacao se dividen en dos grandes categorías: los cacaos finos de aroma, de los cuales hacen parte las variedades criollo, trinitario y forastero; y el cacao común o *commodity* (ver figura 1) que se refiere a un grano que no posee características especiales que aumenten su valor de una forma diferencial. Gran parte del cacao es originario de la zona amazónica ecuatorial, y se dispersó a otros continentes en el siglo XVI. Se tienen reportadas aproximadamente 22 especies pertenecientes a esta planta, la cual tiene un periodo de vida de 40 años ⁵.

El grano de cacao y las hojas del árbol han sido estudiados por diversos autores en lo que se respecta a la composición química de polifenoles y actividad antioxidante, alcaloides, ácidos grasos y carbohidratos ⁴.

El consumo de cacao en forma de chocolate tiene buenos efectos sobre el sistema cardiovascular. Los flavonoides del chocolate tienen una significativa actividad antioxidante, pudiendo proteger los tejidos del estrés oxidativo ²⁰. En el estudio de Fraga y cols. ²¹ se muestra que tras el consumo diario de chocolate con leche conteniendo 168 mg de flavonoles, los marcadores de estrés oxidativo disminuyen favorablemente.

Figura 1. Planta de cacao. ²²



2.2.1.1 Fruto. El fruto es una baya grande denominada “mazorca”, es carnosa y oblonga, esta puede ser de color amarillo, verde o púrpura, su tamaño es de 15 a 20 cm de largo y de 7 a 10 cm de ancho, aproximadamente (ver figura 2). El endocarpio es de aproximadamente 4 a 8 mm de grosor duro, carnoso y leñoso, contiene en su interior de 30 a 40 semillas, las cuales están incrustadas en una pulpa de color blanco llamada mucílago ²³.

Figura 2. Mazorca de cacao **a.** Material sin abrir **b.** Material abierto. Fuente: Las autoras.



2.2.1.1.1 Clones. En el mundo existen diferentes variedades de cacao, originalmente eran sólo dos variedades; el criollo y el forastero, pero el cruce de estas dos especies dio origen al trinitario, y del cruce repetido entre ellos, se originaron los diferentes clones de cacao que se conocen y utilizan. Las mazorcas de los clones de la variedad trinitaria pueden ser de muchas formas y colores; las semillas son más grandes que las del cacao criollo y forastero; las plantas son fuertes, de tronco grueso y hojas grandes. En la actualidad la mayoría de los cacaotales que existen en el mundo son trinitarios²⁴.

En la tabla 1 se presenta una breve información morfo-agronómica e industrial que puede ser de ayuda para identificar o verificar la identidad genética de los clones que serán estudiados en el presente trabajo.

Tabla 1. Información morfo-agronómica del clon de cacao CCN-51 y TSH-565.

Características Morfo - Agronómicas e Industrial		
Clon	CCN-51	TSH-565
Origen	Ecuatoriano	Trinidad
Arquitectura	Erecta	Erecta
Vigor	Vigorosa	vigorosa
Compatibilidad	Auto compatible	Auto compatible
Forma de mazorca	Elíptica	Angoleta
Color de mazorca	Rojo	Rojo
Color de semilla	Purpura	purpura
Forma de semilla	Cilíndrica	Cilíndrica
Nº almendras/mazorca	48	39
Peso almendra	1,4 gramos	1,1 gramos
Nº mazorcas/kilo de cacao seco	24	24

Fuente: Bravo Ramírez (2010)

2.2.1.2 Residuos del cacao. Los residuos del cacao, antes de su transformación industrial, están representados por cáscaras y placentas; los cuales representan no menos del 75% del peso de las mazorcas cosechadas, es decir que máximo un 21% del producto cosechado representa a las semillas o granos que son aprovechados para su transformación en diferentes tipos de productos. Un tercer residuo de importancia es el mucílago, el cual corresponde al 4% restante y que a lo mejor de nuestro conocimiento no ha sido objeto de estudio con anterioridad a este trabajo ⁸.

2.2.1.2.1 Cáscara. La cáscara de cacao, conocida comúnmente como mazorca o cacota (Ver figura 3). Representa el mayor residuo de la industria cacao-cultora, no sólo en Colombia sino a nivel mundial. De acuerdo con su caracterización química, contiene vitaminas A y C, minerales como calcio y magnesio, fibra y pectina ^{5,23}, polifenoles, flavonoides ²⁵.

Figura 3. Cáscara de cacao. ²



Así mismo, varios estudios han encontrado que la cáscara de cacao contiene un pigmento poliflavonoglucósido, el cual se utiliza como colorante de alimentos ²⁶. También contiene entre 3 y 4 % de potasio en base seca. Además, las cenizas de la cáscara de cacao han sido utilizadas para la fabricación de jabón en Ghana y Nigeria ⁸. Finalmente, existe evidencia documentada que la cáscara de cacao se ha

utilizado para la alimentación de porcinos y gallos, como fuente comercial de pectinas, en la producción de espumas de poliuretano para uso hortícola y algunos hacen referencia a la actividad antibacteriana de extractos de la cáscara de cacao frente a *streptococcus mutans* ⁴.

2.2.1.2.2 Mucílago. El mucílago de la semilla del cacao (ver figura 4), llamado también pulpa es parte fundamental en el proceso de fermentación y precursor del aroma del cacao. Al ser parte en el proceso de fermentación, es un inconveniente eliminar una parte del mucílago de las semillas, pero para algunos clones, tales como el CCN-51 que posee una gran cantidad de mucílago se hace necesario eliminar una parte de éste, con el fin de que en el proceso de beneficio se obtenga un grano con buenas características sensoriales ^{27,28}. El mucílago es una pulpa aromática, la cual crece de los tegumentos de las semillas; contiene agua, proteína, fibra, azúcares, glucosa, pectinas y ácido cítrico, se compone de células parenquimatosas esponjosas, conteniendo savia rica en azúcares. Posee un delicioso sabor y ha sido utilizada para producir: mermeladas de cacao, alcohol, vinagre, nata y pulpa procesada ²⁹.

Figura 4. Mucílago o pulpa de la semilla de cacao. Fuente: Las autoras.



2.2.2 Fibra alimentaria (FA) o Fibra dietaria (FD). La fibra dietaria, ha tenido diferentes definiciones. Una de ellas está dada por todos los polifenoles no almidones y la lignina, que no pueden ser absorbidos o digeridos en el intestino delgado. Esta ha recibido nombres como: fibra no nutritiva, salvado, residuo vegetal indigerible, carbohidratos no disponibles, entre otros ³⁰.

El término “fibra dietaria” fue usado por primera vez por Hipsley en el año de 1953³¹. En el año 1969 el Dr. Denias P. Burkitt, fue el pionero en relacionar el cáncer de intestino grueso y otras enfermedades con una dieta carente de fibra dietaria ³². La fibra dietaria (FD) se encuentra principalmente en las paredes de las células vegetales y ha sido definida por la Asociación Americana de la Química de los Cereales como la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la hidrólisis por enzimas endógenas del sistema digestivo humano y a la digestión y absorción en el intestino delgado, con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso ^{5,9}.

Así mismo, es una sustancia esencial para que una dieta sea considerada equilibrada, ya que no se debe abusar de su consumo. Su uso ha sido un tema de considerable interés para los nutricionistas y médicos en los últimos 35 años ³³.

La FD se clasifica en dos (2) tipos: fibra dietaria soluble (FDS) y fibra dietaria insoluble (FDI), dependiendo de su solubilidad con el agua. Esta clasificación se hace manteniendo controladas condiciones como el pH y las enzimas ³⁴. La fibra dietaria tiene resultados distintos al pasar por el intestino delgado y por el intestino grueso, ya que esta retiene agua, nutrientes, ácidos biliares y agentes carcinogénicos ⁵. La FD se halla presente en alimentos exclusivamente de origen vegetal como son: cereales, harinas integrales (avena, trigo, cebada, centeno, maíz y arroz integral), legumbres, frutos secos, verduras y hortalizas. La fibra dietaria tiene un particular efecto beneficioso en la salud humana y en la prevención de

ciertas enfermedades como diabetes, cáncer de colon, enfermedades cardiovasculares, diverticulitis, hipercolesterolemia, entre otras ³⁰.

La FD es conocida como constituyente efectivo en la salud. No es atacada por las enzimas del estómago ni del intestino delgado, lo cual permite que llegue al colon sin ser degradada. La fibra dietaria soluble (FDS) y la fibra dietaria insoluble (FDI) cumplen diferentes funciones en el organismo ¹¹.

2.2.2.1 Fibra dietaria soluble (FDS o FS). Las fibras solubles o totalmente fermentadas, son aquellas que forman una dispersión en agua; la cual conlleva a la formación de geles viscosos en el tracto gastrointestinal, favoreciendo la absorción de agua y sodio. Desde el punto de vista fisiológico intestinal, estas fibras retrasan el vaciamiento gástrico y hacen lento el tránsito intestinal, puede ser saludable en algunos casos, haciendo más eficiente la digestión y absorción de alimentos y generando mayor saciedad. Este tipo de fibra se asocia con el metabolismo de carbohidratos y lípidos ³⁵. Está conformada por pectina, gomas y mucílagos, almidón resistente y algunas hemicelulosas. Se encuentran presentes principalmente en frutas, legumbres y cereales como cebada y avena ³⁶.

2.2.2.2 Fibra dietaria insoluble (FDI o FI). Las fibras insolubles o parcialmente fermentadas en el intestino por las bacterias colónicas, no forman dispersión en agua, estas tienen su mayor influencia en el intestino grueso, ya que en ella están presentes la celulosa y la lignina; esta última tiene gran importancia en controlar los niveles de colesterol en la sangre, en tanto que se une a los ácidos biliares. Es de mencionar que la fibra insoluble es importante por su capacidad de aumentar el volumen de las heces hasta 20 veces su peso, gracias a su capacidad de retención de agua, siendo de gran efecto contra el estreñimiento. La FDI se encuentra en la harina de trigo integral, el salvado de trigo, cereales integrales, semillas, lechuga, espinacas, repollo, acelgas, brócoli, uvas, uvas pasas y frutas secas ^{35,36}.

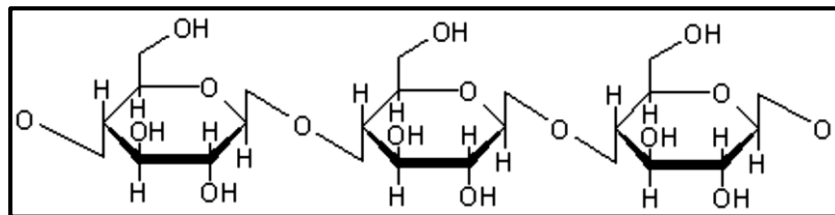
2.2.2.3 Reglamentación para el consumo de fibra dietaria. En Colombia, la resolución 333 de 2011 del Ministerio de Protección Social, fijó para niños mayores de 6 meses y menores de 4 años, un valor diario de referencia (VDR) de fibra dietaria de 19 g/día, mientras que para niños mayores de 4 años y adultos, el VDR es de 25 g/día en una dieta de 2 000 calorías. ^{9,37}.

En el año 2002, la *National Academy of Sciences* (NAS; Estados Unidos), y *Food Nutrition Board* de los Estados Unidos, establecieron las nuevas recomendaciones de ingesta adecuada (AI- *Adequate Intake*) de fibra dietaria para los diferentes grupos de la siguiente manera: una ingestión de fibra dietaria de 25 y 38 gramos al día, para hombres y mujeres, respectivamente (a partir de los 4 años). Estos valores se fijaron con base en la observación de los niveles de ingestión que ejercen una protección contra enfermedades coronarias. Para, el caso de los niños de 1 a 3 años, la AI se situó en 19 gramos al día ³².

2.2.2.4 Componentes de la Fibra dietaria

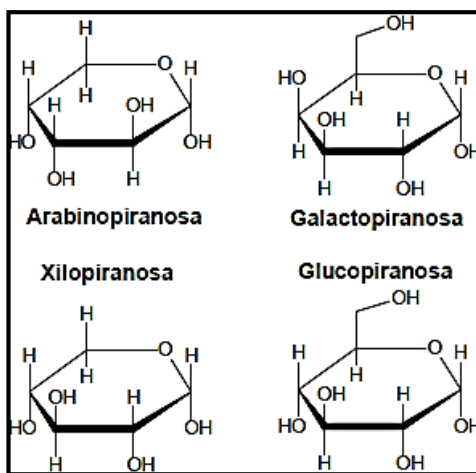
2.2.2.4.1 Celulosa. La celulosa, es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa las cuales están unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos (ver figura 5) de al menos 500 residuos de β -D-glucosa unidos covalentemente ⁵. Es el componente principal de las plantas, y se puede degradar hasta la D-glucosa. La configuración β le permite formar grandes cadenas lineales. Las fibras de celulosa se estabilizan por puentes de hidrógeno entre la misma molécula y de igual manera entre moléculas adyacentes. Entre las paredes celulares de las plantas las fibras de celulosa se enlazan mediante una matriz que contiene otros polisacáridos y lignina ³⁸.

Figura 5. Estructura molecular de la celulosa. ⁵



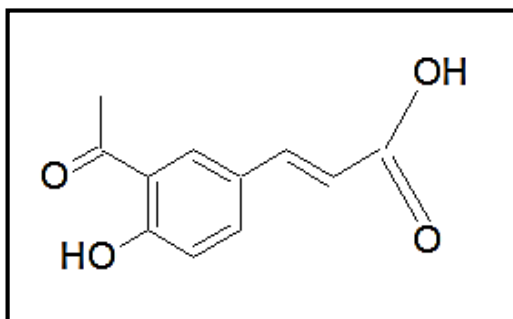
2.2.2.4.2 Hemicelulosa. La hemicelulosa es un grupo heterogéneo de polisacáridos (pentosas, sobre todo D-xilano) ramificados que se unen fuertemente entre si y las microfibrillas de celulosa (ver figura 6), mediante puentes de hidrógeno y tienen estructura amorfa. La estructura típica de la hemicelulosa tiene de 200 a 500 monosacáridos por molécula y se sintetizan en el aparato de Golgi. La hemicelulosa más abundante es el xiloglucano ⁵.

Figura 6. Estructura química de los componentes principales de la hemicelulosa.
38



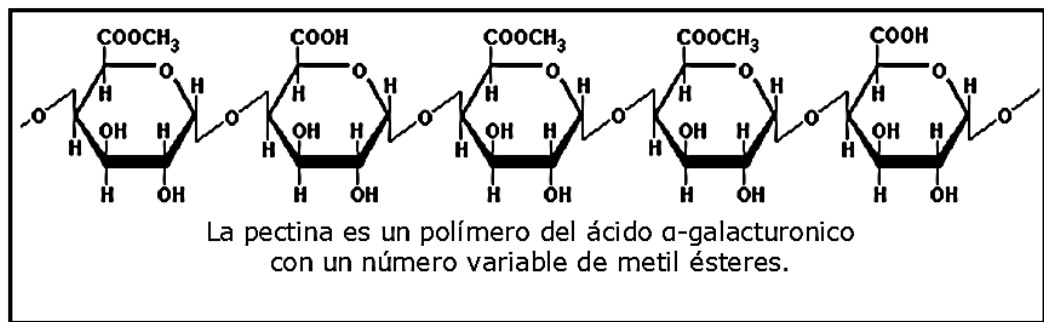
2.2.2.4.3 Lignina. La lignina es una secuencia polifenólica compleja (ver figura 7). Se forma por la polimerización de tres alcoholes aromáticos (cumarilico, coniferilico y el sinapilico), los cuales se unen por un enlace covalente formando una estructura bastante rígida y resistente a la degradación ³⁹.

Figura 7. Lignina. ³⁸



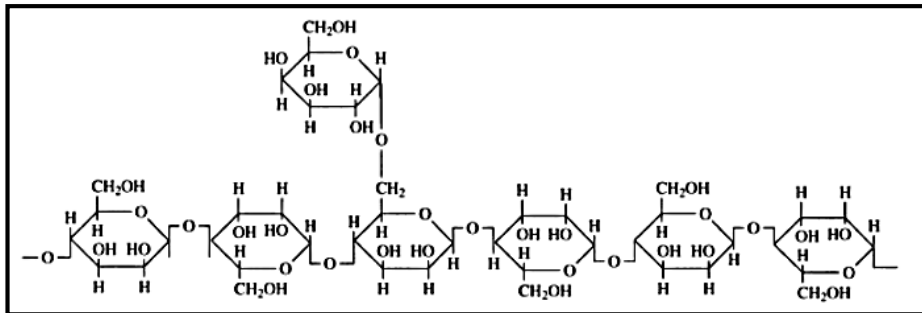
2.2.2.4.4 Pectinas. Las pectinas son compuestos naturales que se encuentra en todos los vegetales, principalmente se encuentra en los frutos, ya que este es responsable de su textura. Se conocen dos tipos de pectinas: una de alto índice de metoxilo conocida como HM y la otra con bajo índice de metoxilo conocida como LM. Es un polisacárido heterogéneo que contiene gran cantidad de ácido galacturónico (ver figura 8) ⁴⁰.

Figura 8. Estructura de la pectina. ⁴¹



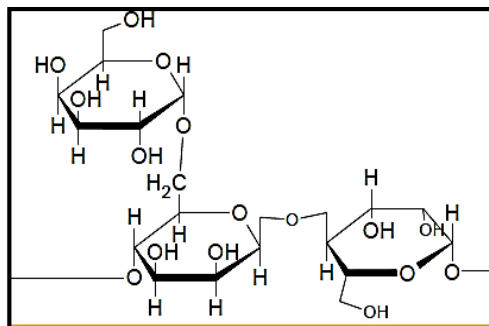
2.2.2.4.5 Mucílagos. El mucílago es un producto orgánico del cual no se conoce una estructura molecular completa. Está formado por polisacáridos celulósicos que contienen igual cantidad de gomas y pectinas (ver figura 9). Los mucílagos producen coloides muy poco viscosos que presentan actividad óptica y pueden ser hidrolizados y fermentados ^{5,42}.

Figura 9. Cadena de mucílago de la semilla de algarroba ⁴².



2.2.2.4.6 Gomas. Las gomas están formadas por cadenas largas de ácido urónico, xilosa, arabinosa o manosa (ver figura 10). Estas previenen la transformación de polisacáridos de la pared celular. Algunas secreciones de los árboles, aparecen como masas vidriosas en los tronco, causadas por heridas o enfermedades ⁴².

Figura 10. Estructura de la goma agar ⁵.



En la tabla 2 se encuentran algunos de los componentes químicos presentes en la fibra dietaria y su respectiva cadena principal ⁴³.

Tabla 2. Composición química de la fibra dietaria.

FIBRA	CADENA PRINCIPAL	REFERENCIA
Celulosa	β -(1,4) glucosa	Olson y col. (1987)
β -glucanos	β -(1,4) glucosa and β -(1,3) glucosa	Johansson y col. (2000)
Homogalacturonano	α - (1,4) de ácido D-galacturónico (algunos de los grupos carboxilo esterificados son metilo)	Ridley, O'Neill y Mohnen (2001)
Ramnogalacturonano-I	(1-4) ácido galacturónico, (1,2) ramnosa y de 1, 2, 4-ramnosa	Oechslin, Lutz, y Amado (2003)
Ramnogalacturonano-II	α - (1,4) de ácido galacturónico	Vidal, Doco, Williams, y Albersheim (2000)
Xylogalacturonan	α - (1,4) de ácido galacturónico	Le Goff, Renard, Bonnin, y Thibault (2001)
Inulina	β - (1,2) -D-fructosil-fructosa	Blecker y col. (2001)
Goma de semilla de <i>Abutilon indicum</i> : e.g.1	β - (1,4) -D-manosa	Sing, Mishra, Khare, Khare y Gupta (1997)
Goma de semilla de <i>Lesquerella fendleri</i> : e.g.2	Ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa, ácido galacturónico	Abbott, Wu, Carlson, Slodki, y Kleiman (1994)
Lignina	Los polifenoles: siringil alcohol (s), guayacil alcohol (G) y alcohol p-cumaril (H)	Sun, Tomkinson, y Bolton (1999)
Quitosano	β - (1,4) = Conectado D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina	Borderis y col. (2005)

Fuente: Yangilar (2013)

2.2.2.5 Importancia de la Fibra Dietaria. El gran interés por la fibra dietaria se remonta a la década del setenta cuando investigadores como Trowell, Burkitt y otros; basándose principalmente en estudios epidemiológicos relacionaron la deficiencia de FD con la existencia de una serie de enfermedades como diabetes, hemorroides, diverticulosis, cáncer de colon, estreñimiento, obesidad y enfermedad cardiovascular ⁴⁴⁻⁴⁶.

La fibra dietaria, ha sido conocida e investigada por un periodo de tiempo bastante largo y su delimitación precisa ha sido objeto de mucha discusión y controversia. De ser considerada como un residuo, paso a ser descrita como un remedio universal que mejora cualquier problema fisiológico en el organismo humano. Además, durante los últimos años ha adquirido una importancia adicional relacionada con su uso como ingrediente funcional ¹³.

La fibra juega un papel en todas las funciones del sistema digestivo desde la masticación hasta la evacuación de las heces. Las dietas con un contenido de fibra elevado requieren más tiempo de masticación por lo que enlentecen la velocidad de deglución y esto implica una mayor salivación que va a repercutir en la mejora de la higiene bucal ³³. Las propiedades fisiológicas de la fibra dietaria, como la capacidad de retención de agua, de aceite, de hidropesía y capacidad de intercambio catiónico, le brindan a la fibra una gran importancia en el funcionamiento de la digestión ³².

Esta tiene muchos beneficios, ya que ayuda a controlar enfermedades crónicas, se puede encontrar en alimentos como son el trigo, lentejas, frutas, vegetales, entre otros. Según la *American Dietetic Association*, nuestro cuerpo requiere de fibra para mantener un buen funcionamiento, se deben consumir aproximadamente de 20 a 35 g de fibra al día ⁴⁷.

Además de encontrarse naturalmente en las frutas y verduras, la tendencia actual es la de incorporarla en diferentes productos alimenticios. Dicha incorporación o funcionalización de productos es muy importante para el consumidor de hoy que está en busca de alimentos que generen efectos benéficos sobre la salud (CONACTA, 2016). No obstante, la función fisiológica y el comportamiento de la FD al ser adicionada depende de la relación que guarden sus fracciones de FDI:FDS ó FDI/FDS; y en ese sentido se buscan y estudian fuentes que cumplan con esta característica. Entre las fuentes de fibra para uso en alimentos, se considera buenas aquellas que posean una relación FDI:FDS de 2:1 y 2,3:1 y excelentes si la relación FDI:FDS es 1:1 ⁴⁸, aunque aproximadamente el 75% de la fibra dietaria encontrada en alimentos naturales corresponde a la fracción insoluble. Mientras que la recomendada por la OMS (organización mundial de la salud) sobre la cantidad de fibra que debe ser ingerida por el hombre debe tener una proporción FDI:FDS de 3:1 ^{10,49}.

2.2.3 Obtención y caracterización de la fibra dietaria. Como consecuencia de la importancia que ha adquirido FD en los últimos años, numerosos métodos han sido desarrollados para su determinación. Varios son muy específicos y precisos para la identificación y cuantificación de los diferentes componentes de la FD. Así mismo, hay muchos de ellos que usan enzimas altamente purificadas que liberan selectivamente oligosacáridos y polisacáridos que constituyen FD ¹³.

El primer método fue reportado gracias a que en la Estación experimental de Weende, Gottinger, Alemania, se desarrolló un método de fibra cruda el cual consiste en la extracción secuencial con diluciones ácidas y alcalinas; este método fue adoptado por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC) para la determinación de la fibra hasta 1960. Más tarde se propuso el aislamiento de la fibra mediante la digestión de las muestras con ácido tricloroacético, ácido acético y nítrico, los cuales no solubilizan la celulosa, solamente lignina ^{13,32}; después de la

aceptación de este método por parte de la comunidad científica internacional, fue conocido como el método fibra detergente ácido, que mide la celulosa y la lignina ⁵.

2.2.4 Fundamentación de las técnicas de análisis

2.2.4.1 Métodos de análisis de fibra dietaria. Ningún método analítico es capaz de medir todos los componentes de la fibra en los alimentos. Existen diversos métodos para aislar y fraccionar el grupo de sustancias que la conforman⁷. Los métodos para determinar la FD pueden desglosarse en métodos gravimétricos y métodos enzimático–químicos, los cuales se subdividen, a su vez, en otros grupos.

Los métodos gravimétricos se basan en pesar el residuo que queda después de una solubilización enzimática o química de los componentes que no son fibra, entre este grupo se encuentra el químico–gravimétrico, enzimático–gravimétrico y el químico–enzimático–gravimétrico. En la tabla 3 se muestra la subdivisión de los métodos gravimétricos y el alcance de determinación de cada uno de ellos ⁵⁰.

Tabla 3. Generalidades de los métodos gravimétricos para la determinación de fibra en alimentos, de acuerdo con la aproximación de análisis empleada.

Técnica analítica de determinación	Método	Comentarios
Químico- gravimétrico.	Fibra cruda (tiene poca significancia fisiológica en la nutrición humana) ⁵¹ .	Los valores de fibra cruda no tienen relación con el verdadero valor de FD ⁵⁰ .
	Fibra ácido detergente.	Este método da una buena estimación de celulosa y lignina ⁵² .
	Fibra neutro detergente.	Este método da una buena estimación de la fibra dietaria insoluble. La gran desventaja es que la FDS se pierde ⁵³ .
	Fibra dietética total simplificada.	Especialmente apto para el análisis de FDT en productos con bajo contenido de almidón; este método sobreestima el contenido de FDT ⁵⁴ .
Enzimático- gravimétrico	Determina la fibra dietaria soluble e insoluble, sin embargo, no hay información detallada sobre los componentes de la FDT. Se han realizado modificaciones en el uso de las enzimas que permiten reducir los tiempos de análisis y mejorar la precisión del ensayo ⁵⁰ .	
Químico-enzimático- gravimétrico	Fibra dietética total (fibra neutro detergente + fibra dietaria soluble).	Solamente para determinación de FDT y no para determinaciones de FDS y FDI ⁵⁰ .

Fuente: Las autoras.

Los métodos enzimático-químicos consisten en aislar los residuos de FD por acción enzimática y en liberar por hidrólisis ácida los azúcares neutros que constituyen los polisacáridos de la fibra y medirlos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases (GC) o colorimétricamente. Los ácidos urónicos se

determinan colorimétricamente o por descarboxilación y la lignina se determina generalmente por gravimetría ^{50,53}. En la tabla 4 se muestra la subdivisión de los métodos enzimático–químico y el alcance en determinación de cada uno de ellos ⁵⁰.

Tabla 4. Subdivisión de los métodos enzimático–químico, según su técnica analítica de determinación.

Técnica analítica de determinación	Método	Comentarios
Colorimétricos	Método de Southgate: ⁵⁵ .	La ventaja del método es que proporciona una información del perfil de los componentes de la fibra. Su desventaja es que es complejo y sobreestima el valor de FD. Se basa en el fraccionamiento de FD en polisacáridos no celulósicos solubles e insolubles medidos colorimétricamente.
Cromatografía de gases	Método de Englyst y col.	Es posible obtener en un mismo ensayo la determinación de los polisacáridos que no son almidón, polisacáridos no celulósicos y polisacáridos insolubles que no son almidón. Sin embargo, no es posible medir la lignina ⁵³ .
	Método de Theander y col. ⁵⁶ .	Se describen 3 métodos que permiten determinar la FDT o clasificada en soluble e insoluble. Los azúcares neutros se analizan por GLC, los ácidos uránicos por descarboxilación y la lignina por gravimetría. Este método incluye almidón resistente y lignina.
Cromatografía líquida de alta presión	Se determina la composición de los monosacáridos de los residuos de FD empleando HPLC. Aunque este método parece promisorio, su precisión necesita evaluarse en estudios colaborativos ⁵⁰ .	

Fuente: Las autoras.

Debido a que la determinación de fibra dietaria en matrices alimenticias ha sido una labor difícil (debido a la complejidad inherente de la matriz), los métodos para su determinación han sido objeto de modificación constante.

Es así que el método que se elija debe adecuarse al propósito y matriz alimenticia a analizar. Si es para etiquetado nutricional o para propósitos de control de calidad, los métodos enzimático–gravimétricos serán los adecuados, ya que son métodos analíticos sencillos y rápidos, que pueden ser ampliamente utilizados ⁵⁷. Pero si se quiere una información más detallada en términos de investigación, obligadamente habría que usar los métodos cromatográficos ⁵⁰.

2.2.4.1.1 Método enzimático–gravimétrico para la determinación de fibra. El método enzimático–gravimétrico es un método amplio, para determinar los componentes individuales de fibra dietaria, permite cuantificar la proporción de fibra dietaria soluble y fibra dietaria insoluble ³².

El sistema gravimétrico–enzimático se basa en la cuantificación de la fibra como el residuo que queda después del tratamiento de las muestras con enzimas específicas que degradan el almidón y las proteínas ²². Específicamente se emplea α -amilasa para la eliminación del almidón retenido en el residuo. Además de α -amilasa se utiliza una pepsina para la digestión de las proteínas ⁵⁸ y se incluye también, un análisis paralelo de la fracción de FDS por cuantificación gravimétrica tras precipitación con etanol ⁷.

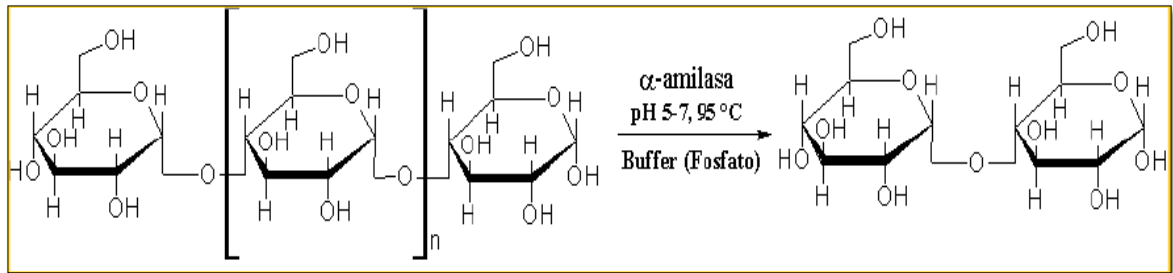
Entre los procedimientos descritos en la literatura, se destaca el propuesto por Asp y col. (1983), en el que se usan las enzimas amilasa, pepsina y pancreatina. El procedimiento permite obtener el valor de FDT, si la precipitación con alcohol se realiza inmediatamente después de la incubación con las enzimas, o el de FDI y FDS por separado ⁵⁹. También se puede emplear amiloglucosidasa o una mezcla de

bilis y pancreatina sin tratamiento térmico previo, con el fin de conseguir un tratamiento enzimático único. Sin importar el conjunto de enzimas empleados en los métodos enzimáticos–gravimétricos, se debe tener muy presente que éstas deben ser enzimas altamente purificadas, para evitar resultados poco reproducibles, al determinar FD de los alimentos que contienen cantidades significativas de β -glucanos, almidón y fructanos resistentes ¹³.

Las principales ventajas del método enzimático–gravimétrico son que es relativamente exacto y preciso, comparado con otros procedimientos. Más aún, estos métodos son simples, económicos y sencillos de implementar y realizar y no requieren una alta inversión de capital; particularmente cuando se comparan con métodos más sofisticados usando técnicas de GC o HPLC ⁵⁰.

2.2.4.1.1.1 α -amilasa Termoestable. El almidón está formado por dos moléculas: la amilosa y la amilopectina, ambos polisacáridos de glucosa. La amilosa se conforma por cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces α -1-4, mientras que la amilopectina tiene además uniones α -1-6 y por esta razón forma cadenas ramificadas ⁵³. La α -amilasa es una enzima extracelular que hidroliza los enlaces α -1-4 glicósidos de polisacáridos, tales como el almidón, glicógeno o productos de degradación de los mismos (ver figura 11) ⁶⁰, dejando dextrinas lineales y ramificadas (oligosacáridos) como productos ⁵³.

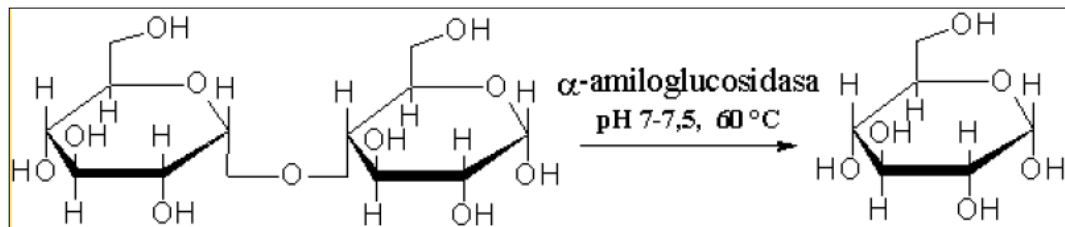
Figura 11. Hidrolisis de la α -amilasa termoestable ⁵.



2.2.4.1.1.2 Pepsina. Un enlace peptídico es la unión entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua ⁵³. Su función radica en realizar la degradación de proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos. Elevaciones de pH por encima de 4 inactivan su funcionamiento ⁶¹.

2.2.4.1.1.3 Amiloglucosidasa. Esta enzima actúa sobre el almidón gelatinizado, libera de forma secuencial unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores de las moléculas de amilosa y amilopectina, actuando sobre los enlaces α -1-4 y α -1-6 ^{62,63} (ver figura 12). En consecuencia es capaz de hidrolizar el almidón por completo para dar moléculas de glucosa, pero se usa en general en almidón que ha sido previamente despolimerizado con α -amilasa para generar pequeños fragmentos y más extremos no reductores ⁵³.

Figura 12. Hidrolisis de la amiloglucosidasa ⁵.



2.3 ESTADO DEL ARTE

2.3.1 Antecedentes determinación de fibra dietaria en residuos de cacao. En la industria de alimentos se han determinado diferentes métodos de detección de fibra dietaria, donde se han utilizado equipos analíticos bajo condiciones específicas, para la obtención de valores con altos niveles de confianza.

En la actualidad se tiene una evolución constante y una gran prevención a enfermedades crónicas no transmisibles. Aquí nacen los alimentos funcionales, que son diseñados o determinados para realizar alguna función en el organismo, adicionando un valor nutritivo ³⁶.

En lo que respecta a los residuos del cacao, se han desarrollado diferentes investigaciones centradas en evaluar su uso como potencial fuente de fibra dietaria³³, en la tabla 5 se relacionan algunos estudios realizados a la cáscara y el mucílago por medio del método enzimático–gravimétrico.

En todos los trabajos analizados, la determinación de los contenidos de FDI y FDS fueron desarrollados siguiendo el procedimiento estandarizado de la AOAC para determinar FDS y FDI. De manera general, los resultados de los diferentes trabajos realizados muestran que los valores de FDI y FDS están cercanos al 60 y 4 g/100 g BS, respectivamente. En lo que respecta al mucílago, los resultados de los trabajos muestran que este contiene mayor cantidad de FDS que de FDI, con valores de 18 y 0,9 g/100 g BS ^{10,64,65}.

Tabla 5. Estudios realizados a cacao por un método enzimático–gravimétrico.

AUTOR Y AÑO	ESTUDIO	RESULTADOS
Martin y col. (1994). España <small>65</small>	Cáscara de cacao: Una posible fuente de fibra dietaria.	Exhibió un alto contenido de fibra dietaria total (TDF), 504 g de FD/kg BS. Indicaron que esta puede ser utilizada como fuente de FD en alimentos.
Lecumberri y col. (2006) España <small>66</small>	Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación	La fibra de cacao mostró ser un excelente fuente de FD, con un alto contenido de fibra total, superior al 60 g/100 g BS, con predominio de fracción insoluble 83 g/100 g BS. Esta fibra contuvo un 1,15% de polifenoles, con reducidos valores de capacidad antioxidante. Se concluyó que podría ser utilizada como fuente de fibra dietaria (principalmente insoluble pero también de fibra dietaria soluble) y de compuestos antioxidantes (epicatequina).
Lecumberri y col. (2007) España <small>67</small>	Composición de fibra dietaria, capacidad antioxidante y propiedades físico– químicas de un producto rico en fibra de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	El producto contenía 60,54 g/100 g BS, de los cuales el 10,09 g/100 g BS correspondió FDS y un 50,42 g/100 g BS a FDI; la capacidad antioxidante de esta FD y sus propiedades fisicoquímicas, hacen que este subproducto sea adecuado para ser usado en la preparación de alimentos bajos en calorías.
Abarca y col. (2010) Ecuador <small>49</small>	Identificación de fibra dietaria en residuos de Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Variedad complejo nacional por Trinitario	La cáscara y cascarilla ó testa son buenas fuentes de fibra dietaria insoluble, mientras que el mucílago es una buena fuente de fibra dietaria soluble. Cáscara= 3,30 g/100 g BS de FDS, 60,79 g/100g BS de FDI Mucílago= 16,57 g/100g BS de FDS, 0,95 g/100g BS de FDI.

Abarca y col. (2010) Ecuador <small>64</small>	Residuos de Café, Cacao y Cladodio de Tuna: Fuentes Promisorias de Fibra Dietaria	Cáscara= 59,74 g/100 g BS de FDI y 4,7 g/100 g BS de FDS Mucílago= 0,95 g/100 g BS de FDI y 16,57 g/100 g BS de FDS La cáscara de cacao, es fuente principalmente de FDI. El mucílago de cacao presenta una alta cantidad de fibra dietaria soluble de más de 80% de su contenido total de fibra dietaria.
Aguilar y col. (2011) Ecuador <small>10</small>	Modificación enzimática de la fibra dietaria de la cáscara del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) variedad Complejo nacional trinitario por	Se estudió la influencia de la modificación enzimática para llegar a una relación de FDI:FDS de 3:1 y se obtuvo que el tipo de enzima, volumen y sitio si afecta el balance de FDI:FDS variando de 18,44:1 a 5,91:1 y de 27,2 :1 a 4,94:1 Contenido de FD en residuos de cacao: 56,82 g/100 g BS de FDI y 3,08 g/100 g BS de FDS para el sector de Taura y 64,06 g/100 g BS de FDI y 2,35 g/100 g BS de FDS para el sector de Cone.

Fuente: Las autoras BS=base seca

La determinación de fibra se ha implementado también en diferentes tipos de matrices utilizando los métodos enzimáticos–gravimétricos, entre las matrices que sobresalen están el salvado de trigo, arroz y soja; en la tabla 6, se muestran los análisis implementados para cada una de las matrices ⁶⁸.

Tabla 6. Estudios de determinación de fibra realizados a diferentes matrices por métodos enzimáticos–gravimétricos.

AUTOR	MATRIZ	DETERMINACIÓN
Prosk y col. 1985	Productos alimenticios (soya, pan de centeno, patatas, arroz, salvado de trigo, avena, salvado de maíz y harina de trigo)	Fibra dietaria total
Schweizer and Würsch. 1979	Cereales, vegetales y frutas	Fibra dietaria soluble Fibra dietaria insoluble Fibra dietaria total
Lee y col., (AOAC 991.43) 1992	Pulpa de manzana, piel de naranja, cáscara de pomelo y cáscara de limón	Fibra dietaria soluble Fibra dietaria insoluble Fibra dietaria total
Li and Cardozo, (AOAC 993.21) 1994	Frutas y verduras (manzanas, albaricoques, col, zanahorias, cebollas y fibra de soya)	Fibra dietaria total
Mongeau and Brassard, (AOAC 992.16) 1993	Productos alimenticios (nabo, salvado de trigo, frijoles enlatados con salsa de tomate, arroz y trigo de pan)	Fibra dietaria soluble Fibra dietaria insoluble Fibra dietaria total
Prosky y col., (AOAC 991.42) 1988	Salvado de arroz, salvado de trigo, salvado de maíz	Fibra dietaria insoluble

Fuente: Căpriță y Căpriță (2011)

En un trabajo propio del Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA de la Universidad Industrial de Santander, se realizó el análisis bromatológico a las harinas de cáscara de cacao de cinco clones (CCN-51, TSH-565, FLE-3, FDSV-155, ICS-95) el análisis se ve en la tabla 7, mostrando hasta el momento que solo se ha hecho una caracterización de fibra cruda y era de gran

importancia determinar la cantidad de fibra dietaria soluble e insoluble presente en estos residuos. Gracias al análisis realizado a los cinco clones se pudo determinar que los clones más apropiados para la realización del trabajo eran el CCN-51 y el TSH-565 ya que estos clones contenían un porcentaje de fibra cruda >20% en comparación con los otros tres clones¹⁹.

Tabla 7. Análisis bromatológico a las harinas de cáscara de cacao de cinco clones.

CLON	Humedad +/- 0,3	Ceniza +/- 0,01	Valor calórico	Proteína +/- 0,05	Fibra cruda +/- 0,1	Carbohi- dratos totales	Grasa +/- 0,01
CCN-51	9,97	7,47	332,34	5,42	20,87	76,72	0,42
TSH-565	8,51	5,88	344,74	4,78	30,16	80,37	0,46
ICS-95	5,72	7,74	352,21	7,19	11,90	78,14	1,21
FSV-155	7,08	6,96	351,99	7,70	14,10	76,63	1,63
FLE-3	5,90	7,77	347,97	4,26	15,24	81,54	0,53
Valor medio	7,04 +/- 1,2	6,83 +/- 1,0	347,4 +/- 6,8	5,75 +/-1,5	21,80 +/- 9,1	79,77 +/- 2,8	0,59 +/- 0,3

Fuente: Carreño y Rojas (2014)

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos y solventes

- Buffer fosfato (pH 6 y 0,08 M): 1,4 g de Na_2HPO_4 y 9,86 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- HCl 0,2 M y 5 M
- NaOH 5% p/v
- Etanol al 95% v/v
- Acetona
- H_2SO_4 al 98%
- Tabletas catalizadoras Kjeldahl
- H_3BO_3 al 2% p/v

3.1.2 Enzimas

- α -amilasa termoestable.
- Pepsina (actividad enzimática 944 U/mg proteína).
- Amiloglucosidasa (actividad enzimática ≥ 300 U/mL).

3.1.3 Material de referencia certificado. El material de referencia certificado fue un chocolate negro ref.2384 ⁶⁹.

3.1.4 Materia prima. El material de estudio fue la cáscara y el mucílago de dos tipos de mazorcas de cacao (CCN-51 y TSH-565), suministradas por el CICTA; provenientes del departamento de Santander; CCN-51 de la finca villa Mónica, propiedad de la federación nacional de cacaoteros ubicada en el municipio de San Vicente de Chucuri y TSH-565 de la finca vivero villa Juliana de Rio Negro. Se escogieron estos dos clones como materia prima, ya que en estudios realizados con anterioridad en el CICTA, se encontró que contenían una mayor cantidad de fibra cruda comparada con otros clones.

3.2 EQUIPOS Y MATERIAL DE LABORATORIO

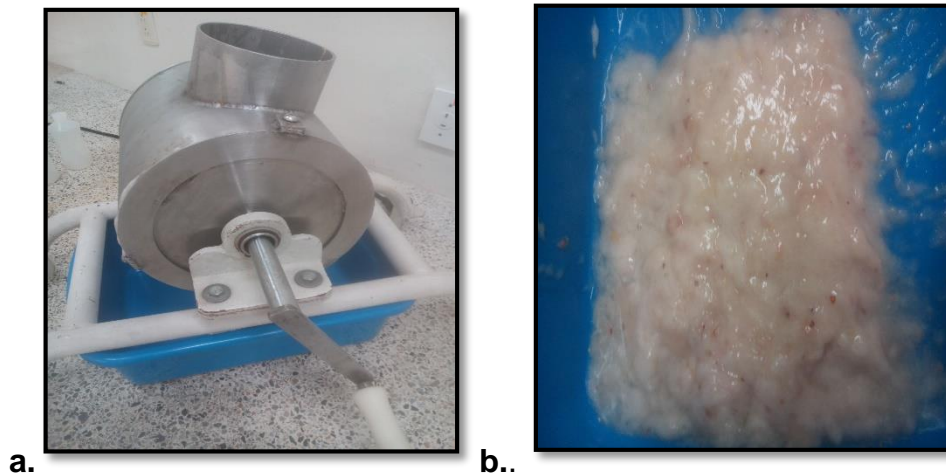
3.2.1 Material de laboratorio. Probetas de 25, 50 y 250 mL, balones aforados de 50, 100, 250 y 1000 mL, vasos de precipitado de 50, 100 y 500 mL, pipetas de 10 ml, micro-pipetas de 100 y 1000 μ L, erlenmeyer de 100 y 250 mL, crisoles, agitador magnético, cajas petri y papel filtro franja negra.

3.2.2 Equipos. Molino de cuchillas (Modelo 4 Wiley Mill), balanza analítica (OHAUS), plancha de calentamiento con agitación, termómetro digital, pH-metro (SCHOTT), unidad de digestión (BÜCHI 426), unidad de destilación (BÜCHI K-314), mufla, estufa, desecador, equipo de filtración al vacío.

3.3 PROCEDIMIENTO

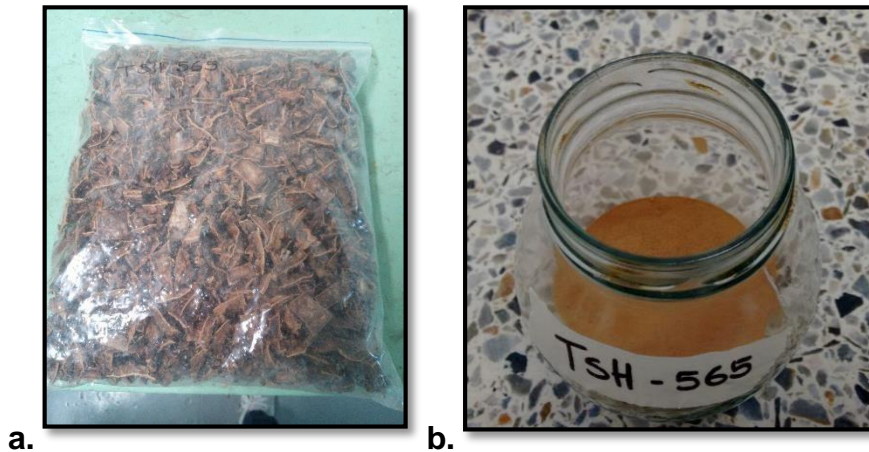
3.3.1 Recolección y acondicionamiento. Las mazorcas fueron seleccionadas según su buen aspecto y grado de maduración, fueron sometidas a un lavado por inmersión en agua potable durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego a una desinfección por un baño en una solución acuosa de hipoclorito de sodio 0,5% (P/V) durante 20 minutos, se escurrieron y secaron. La cáscara se separó de los granos de cacao. Se realizó una disminución del tamaño en las cáscaras dejándolas en pequeños trozos de aproximadamente 1 cm³. Se separó el mucílago de los granos de cacao pasando los granos por el desmucilagador hasta la obtención del mucílago solo (ver figura 13).

Figura 13. a. Desmucilagador b. Mucílago obtenido. Fuente: Las autoras.



3.3.2 Secado y molienda. Cada una de las muestras (cáscara y mucílago) se secaron por separado en una estufa a 60 °C durante 72 horas (tiempo para alcanzar una humedad inferior al 10% en ambos residuos). El valor de la temperatura se fijó en 60°C con el fin de reducir la desnaturalización de compuestos termosensibles ⁴⁸. En la figura 14a se pueden apreciar las cáscaras secas. Después, las cáscaras se colocaron en un desecador, la materia seca se pasó por un molino de cuchillas y por un tamiz hasta obtener un tamaño de partículas de 0,120 mm, la harina obtenida (ver figura 14b) de cada material se conservó por separado en bolsas plásticas con sello hermético a temperatura ambiente.

Figura 14. a. Cáscara seca. b. Harina de la cáscara. Fuente: Las autoras.



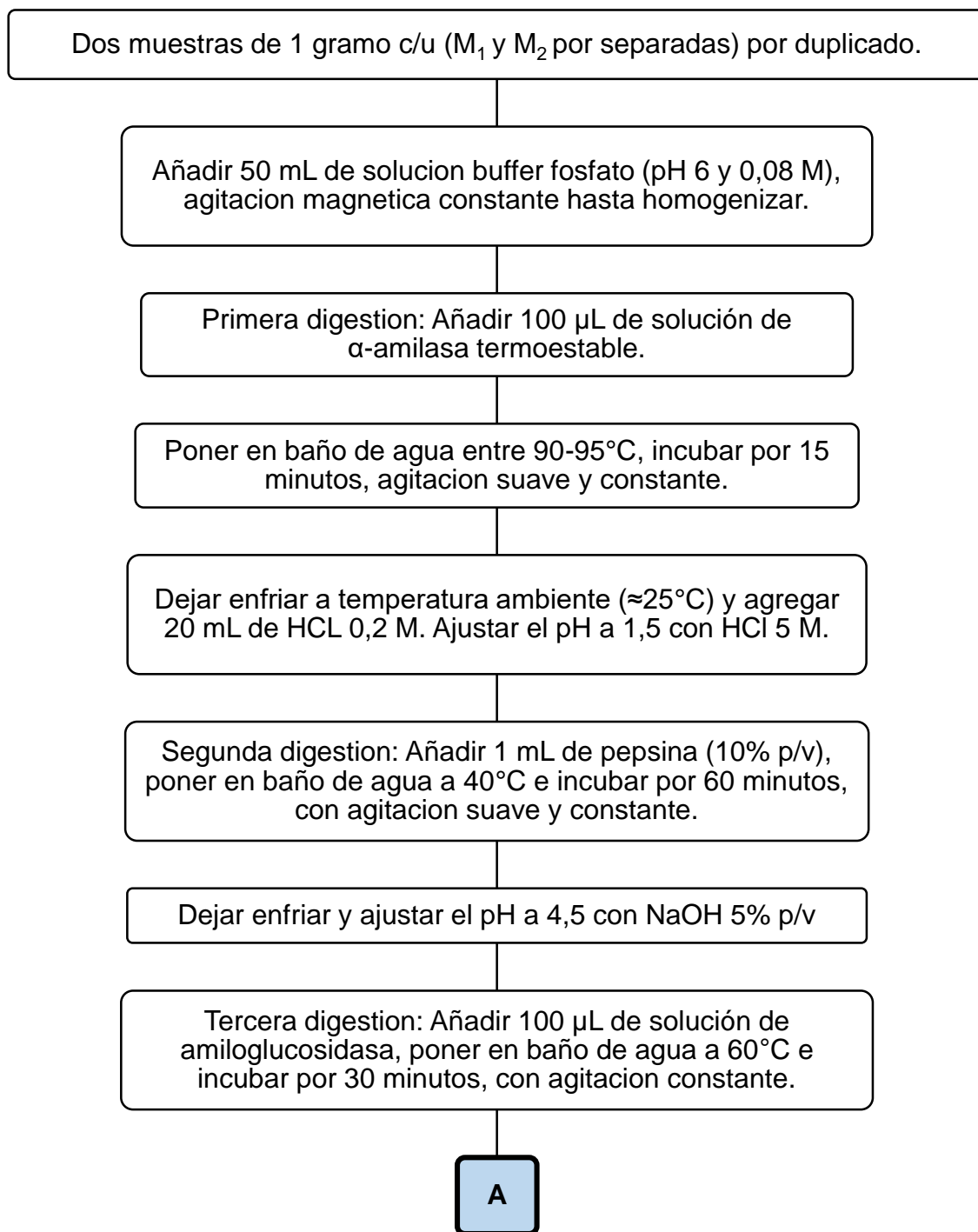
3.3.3 Composición proximal de los residuos de cacao. El análisis proximal de la harina del mucílago se realizó empleando los siguientes métodos AOAC ⁷⁰: cenizas (AOAC 923.03), humedad (AOAC 931.04), proteína (AOAC 920.87), fibra cruda (AOAC 978.10) y grasa (AOAC 920.85). Cabe resaltar que dicho análisis se realizó por triplicado y no se le realizó a las harinas de las cáscaras, ya que estos se habían realizado anteriormente en otro trabajo propio del grupo CICTA (Determinación y ajuste de parámetros cinéticos de la extracción de polifenoles totales a partir de la cáscara de cacao) ¹⁹; solo se reportarán los datos obtenidos en éste .

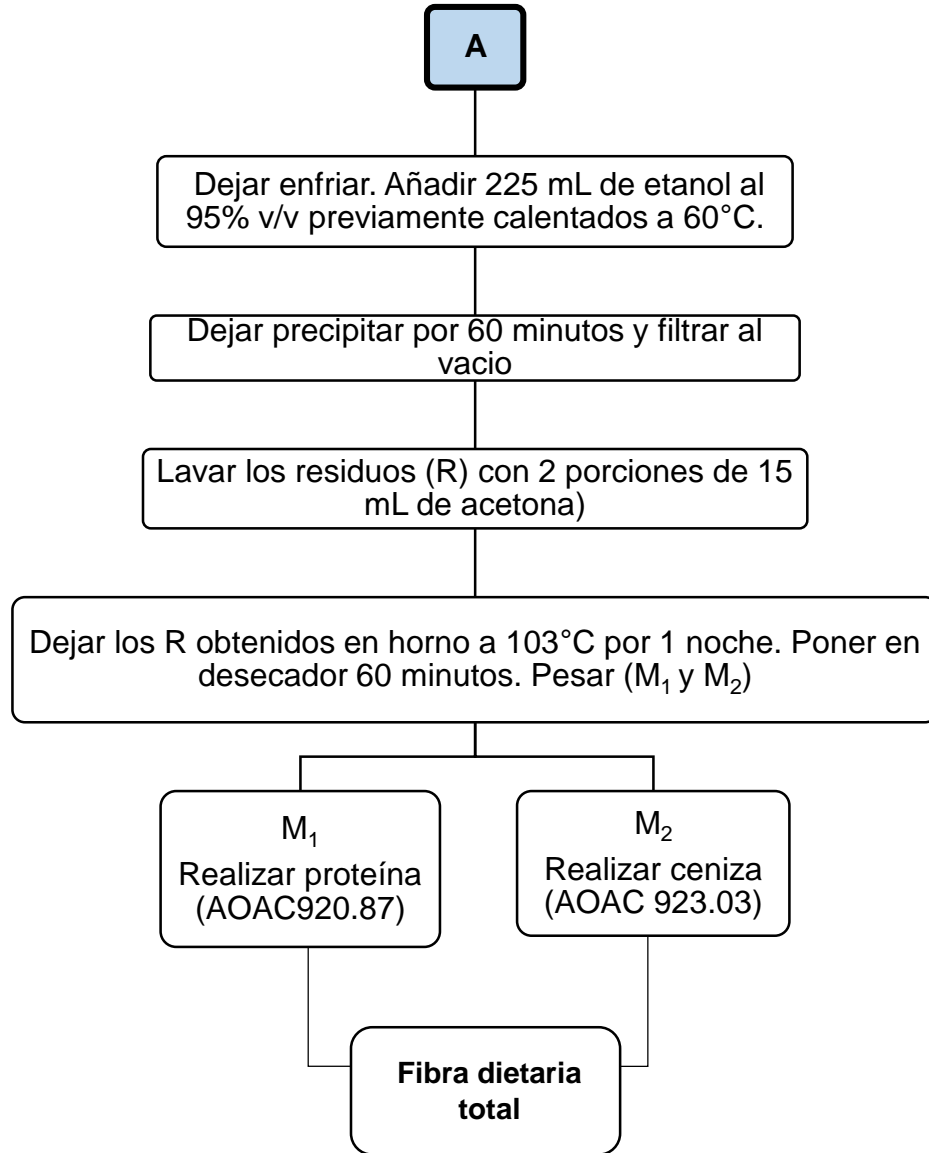
3.3.4 Cuantificación de fibra dietaria (FDT, FDS y FDI)

El método enzimático-gravimétrico desarrollado está basado en las técnicas AOAC 985.29 ⁷¹, 993.19 ⁷² y 991.42 ⁷³, con algunas modificaciones en las enzimas utilizadas; en sus cantidades y tiempos de digestión. El procedimiento para la determinación de la fibra se fundamenta en digerir las proteínas e hidratos de carbono con enzimas específicas, el residuo obtenido después de las digestiones, ya sea el residuo total, el residuo soluble (RS) o residuo insoluble (RI) según el caso, se adjudica a la FD con el previo descuento del contenido de cenizas y proteínas residuales ^{50,74}. Para calcular la cantidad de fibra total y de sus fracciones soluble e insoluble, se utilizaron las ecuaciones planteadas más adelante en el numeral 3.3.8. La metodología se realizó de forma idéntica y por separado, para la cáscara y el mucílago; la única diferencia es el peso inicial de la muestra; para el caso de la cáscara se tomó $1 \pm 0,0020$ gramos y para el mucílago $3 \pm 0,0020$ gramos. En lo que respecta a la proporción de la solución buffer y enzimas utilizadas en cada caso se tuvo en cuenta la relación 1:1 (gramos de muestra a analizar: cantidad de solución y enzimas utilizadas).

3.3.4.1 Fibra dietaria total. Se pesó cada muestra por duplicado en erlenmeyer de 100 mL, se adicionaron 50 mL de solución buffer fosfato (pH 6 y 0,08 M) y se mantuvo en agitación magnética hasta que la muestra se dispersó por completo en la solución; seguidamente se añadieron 100 μ L de solución de α -amilasa termoestable, se cubrió con papel aluminio y se llevó a un baño maría durante 15 min a una temperatura de 90- 95°C con agitación constante y suave. Después, la mezcla sujeta a análisis se retiró del baño y se dejó enfriar a temperatura ambiente (alrededor de 25°C) ⁵. Una vez que la muestra alcanza el equilibrio térmico con el ambiente, se adicionaron 20 mL de solución HCl 0,2 M y se ajustó el pH a 1,5 con solución de HCl 5 M, se agregó 1,0 mL de pepsina (10% p/v) y se cubrió el erlenmeyer con papel aluminio, se colocó en un baño María a 40°C durante 60 minutos con agitación constante y suave ⁵⁸, después de este tiempo se retiró del baño, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se midió el pH y se ajustó a 4,5 usando una solución de NaOH 5% p/v, se adicionaron 100 μ L de solución de amiloglucosidasa. Se volvió a sellar el erlenmeyer con papel aluminio, se llevó a un baño maría durante 30 min con agitación y a 60°C. Cumplido el tiempo, se retiró del baño dejándose enfriar a temperatura ambiente ⁵ y se añadieron 225 mL de Etanol al 95% v/v precalentados a 60°C, se cubrieron los Erlenmeyer con papel aluminio y se dejó precipitar durante 60 minutos, luego se filtró al vacío y se hicieron lavados con 2 porciones de 15 mL de Etanol al 95%, hasta que todas las partículas fueran transferidas al embudo de filtración Büchner, la torta de filtración se lavó con 2 porciones de 15 mL de acetona y los residuos (R) fueron puestos a secar en cajas petri en el horno a 103°C por una noche. Después que la muestra está seca, se colocó en un desecador por 50 minutos se pesó y se realizó un análisis de ceniza en una mufla a 550°C durante 4 horas según el método AOAC 923.03, y con el duplicado se realizó un análisis de proteínas según el método AOAC 920.87.

3.3.4.1.1 Diagrama de la cuantificación de FDT

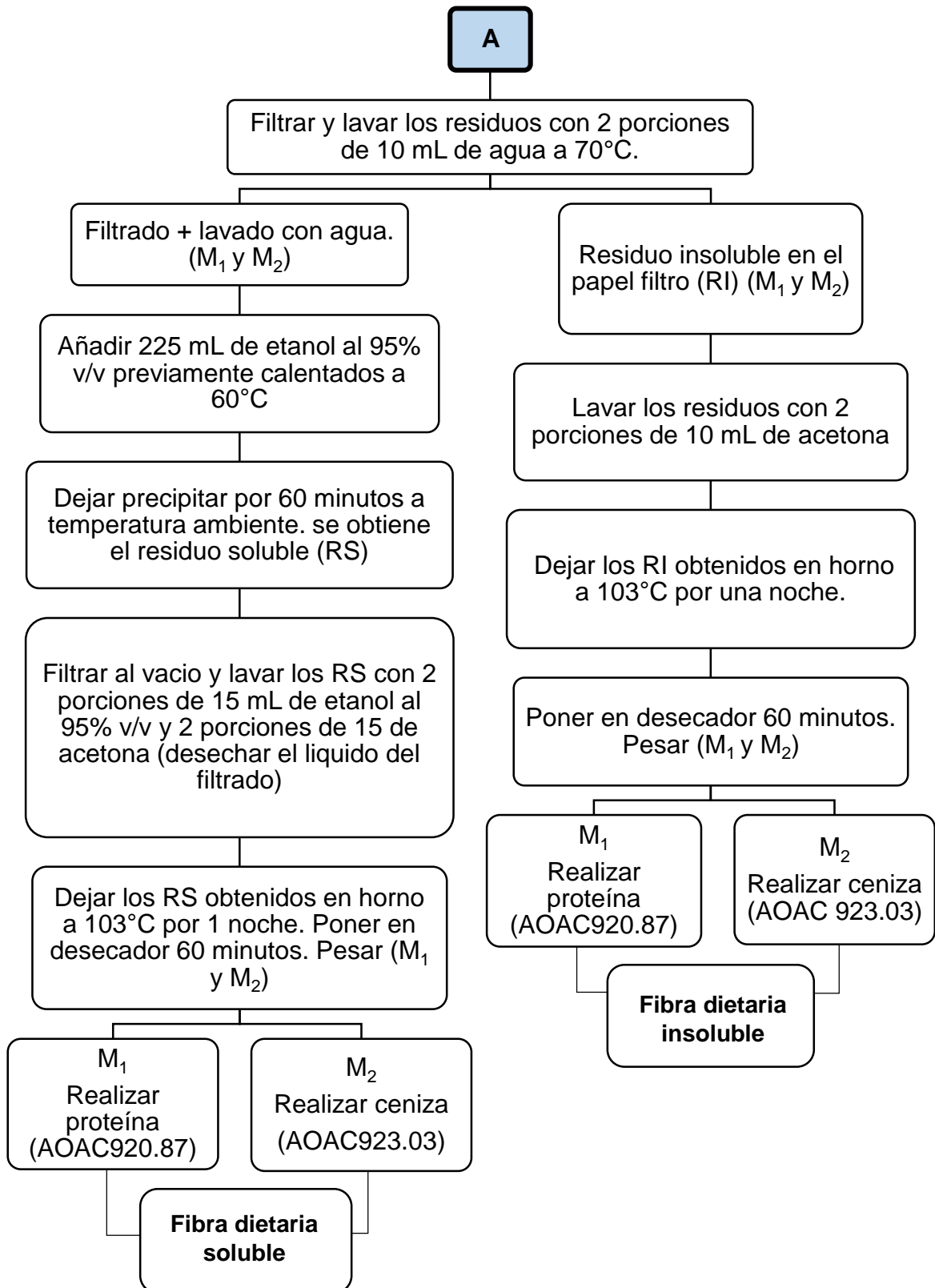




3.3.4.2 Fibra dietaria insoluble. Se pesó cada muestra por duplicado y se realizaron las digestiones enzimáticas tal y como fueron descritas en el numeral anterior. Después de la digestión con amiloglucosidasa, se filtró al vacío y se lavó el erlenmeyer con 2 porciones de 10 mL de agua destilada precalentada a 70°C, hasta que todas las partículas pasaron al retenido (el agua residuo obtenida en la filtración, se conservó para la determinación de fibra dietaria soluble), y la torta de filtración se usa para determinar la FI; se lavó con 2 porciones de 10 mL de acetona, los residuos insolubles (RI) (muestra y duplicado) fueron puestos a secar en caja petri en horno a 103°C por una noche, después se realizó el mismo proceso para la determinación de ceniza y proteína, con el residuo de la muestra se realizó ceniza y con su duplicado proteína.

3.3.4.3 Fibra dietaria soluble. Con el filtrado que se conservó de cada muestra en la determinación de fibra dietaria insoluble se procedió a la determinación de fibra dietaria soluble, para esto se adicionaron 225 mL de etanol al 95 % v/v, previamente calentados a 60°C se tapó el recipiente con papel aluminio y se dejó por 60 minutos en reposo a temperatura ambiente, luego se filtró al vacío y se lavó el recipiente con 2 porciones de 15 mL de Etanol al 95% v/v hasta transferir todas las partículas al embudo de filtración, la torta de filtración se lavó con 2 porciones de 15 mL de acetona, los residuos solubles (RS) fueron puestos a secar en cajas petri en el horno a 103°C por una noche y se realizó de igual manera que en los numerales anteriores para la determinación de ceniza y proteína.

3.3.4.4 Diagrama de la cuantificación de FDI y FDS



3.3.5 Determinación de humedad. Para la determinación se utilizó el método AOAC 931.04 implementado en el laboratorio de alimentos CICTA. A todas las muestras analizadas se le realizó humedad con el fin de expresar los resultados en base seca. Brevemente, el procedimiento seguido es el siguiente: se colocó la caja petri en estufa a 103°C por 60 minutos, después se lleva a desecador por 50 minutos, se pesa la caja petri sola, después se pesa con ± 2 gramos de la muestra, se pone en la estufa a 103°C por 4 horas y se llevan a desecador por 50 minutos y por último se pesó la caja petri con la muestra seca. El contenido de humedad se obtuvo empleando la ecuación 1.

Ecuación 1: Porcentaje de humedad

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Muestra Humeda} - \text{Muestra Seca}}{\text{Muestra Humeda}} \times 100$$

Para dar un dato en base seca se empleó la siguiente formula:

Ecuación 2: porcentaje base seca

$$\text{Base Seca} = \frac{\text{Dato} \times 100}{100 - \% \text{ humedad}}$$

3.3.6 Determinación de ceniza. Para la determinación se utilizó el método AOAC 923.03 implementado en el laboratorio de alimentos CICTA, para la determinación del dato se utilizó la ecuación 3. Este análisis consiste en la pérdida por ignición de todos los componentes orgánicos hasta la obtención de un residuo mineral. Para esto se colocó el crisol solo a 103°C en estufa por 60 minutos, se pasó a desecador por 50 minutos, se pesó el crisol solo y luego se pesó el crisol con la muestra, se pasó a la mufla, se inició un precalentamiento a 300°C por 15 minutos, luego a 350°C por 60 minutos y por último se subió la temperatura a 550°C durante 4 horas, se dejó enfriar y se colocó en desecador por 50 minutos; finalmente se pesó el crisol con la ceniza.

Ecuación 3: Porcentaje de ceniza

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{peso de la Ceniza}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

3.3.7 Determinación de proteínas.

Para la determinación se utilizó el método AOAC 920.87 implementado en el laboratorio de alimentos CICTA. Se pesó la muestra y se adicionó en los tubos del digestor, se le agregó una tableta catalizadora Kjeldahl, después se le agregaron 20 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 98 % y se colocó el tubo en el digestor (ver figura 15a). Seguidamente, se prendió la bomba y la temperatura se programó por 1 hora en el nivel 4 y luego se subió a la temperatura máxima hasta que la muestra tenga un color verde brillante. Se dejó enfriar el tubo y se le agregó 50 mL de agua destilada. Paralelamente, en un Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 50 mL de ácido bórico (H₃BO₄) al 2% p/v y 3 gotas de indicador mixto. Se colocó el tubo con el agua en el destilador (ver figura 15b) y se le agregaron 150 mL de NaOH, el Erlenmeyer con el ácido se usó para recoger el destilado. Se puso en funcionamiento el destilador y cuando se completó un volumen de 200 mL de solución en el Erlenmeyer, se apagó y retiró el tubo. El destilado se tituló con HCl 0,1N hasta que viro de verde a color purpura. Usando la ecuación 4, se calculó el

contenido de nitrógeno de la muestra a partir de la cantidad de amoníaco producido. Utilizando un factor de conversión de 6,25 se relacionó el contenido de nitrógeno del residuo, con el contenido de proteína (ecuación 5).

Ecuación 4: Porcentaje de nitrógeno

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{V_{HCl} * N_{HCl} * 14}{1000 * \text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Donde:

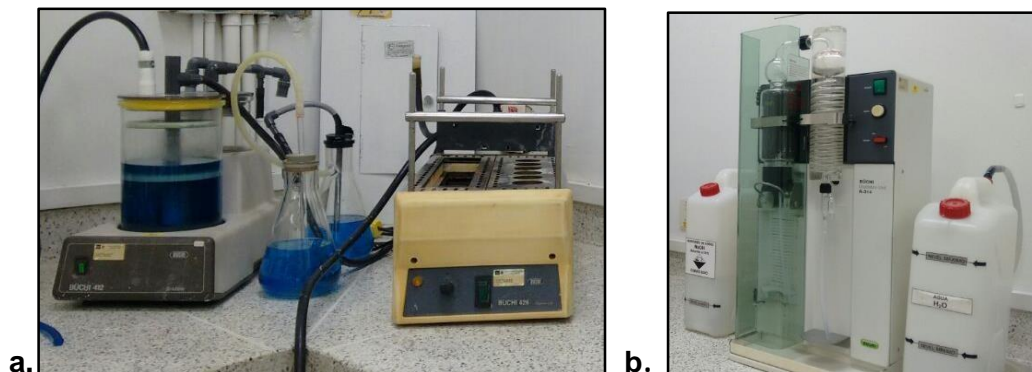
V_{HCl} : volumen en mL de HCl gastado en la titulación

N_{HCl} : normalidad del HCl (0,1N)

Ecuación 5: Porcentaje de proteína

$$\% \text{ Proteina} = \% \text{ Nitrogeno} \times 6.25$$

Figura 15. a. Unidad de digestión (BÜCHI 426). **b.** unidad de destilación (BÜCHI K-314). Fuente: Las autoras.



3.3.8 Cálculo del contenido de fibra dietaria. Las siguientes fórmulas permitieron determinar el porcentaje de fibra dietaria en cada uno de los casos (FDT, FDI y FDS). Teniendo para ello la cantidad de residuo seco obtenido después de la filtración, proteína, ceniza y peso inicial de la muestra.

Ecuación 6: Porcentaje de fibra total

$$\% \text{ Fibra total} = \frac{R - P - C}{M} \times 100$$

Donde:

R= Residuo, RI= Residuo insoluble, RS= Residuo soluble (g)

P=Proteína (g)

C=Cenizas (g)

M= Peso de la muestra (g)

Ecuación 7: Porcentaje de Fibra Insoluble

$$\% \text{ Fibra insoluble} = \frac{RI - P - C}{M} \times 100$$

Ecuación 8: Porcentaje de Fibra soluble

$$\% \text{ Fibra soluble} = \frac{RS - P - C}{M} \times 100$$

La determinación de la fibra total también se puede dar en términos de la suma de los porcentajes de FI y FS como se muestra en la siguiente ecuación.

Ecuación 9: Porcentaje de Fibra total

$$\% \text{ Fibra total} = \% \text{ Fibra insoluble} + \% \text{ Fibra soluble}$$

3.4 PARÁMETROS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO

Para la implementación del método descrito anteriormente se usaron las siguientes figuras de mérito: precisión, repetibilidad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, utilizando un análisis ANOVA y TUKEY para corroborar que los resultados obtenidos por el método implementado no tuvieran diferencias y fueran válidos, coherentes y confiables.

3.4.1 Precisión. La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Para el caso de la repetibilidad, esta se evaluó haciendo repeticiones de la misma muestra con su duplicado, en las mismas condiciones por el mismo analista; mientras que para la precisión intermedia se calculó analizando la misma muestra por diferentes analistas ⁷⁵. Para el análisis de precisión, sólo se analizaron los resultados obtenidos de fibra de los materiales de los clones, a los cuales se le calcularon el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación. Se acepta que el método es preciso para valores del CV menores o iguales al 5% ⁷⁶.

Ecuación 10: coeficiente de variación.

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

3.4.2 Exactitud. Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Esta figura de mérito se determinó utilizando el material de referencia certificado (MRC) descrito en el numeral 3.1.3. Se calculó la diferencia absoluta entre el valor medido y el valor certificado con base a la FDT.

Ecuación 11: Valor de t calculado

$$t_{calc} = \frac{|m - M|}{\sigma} \sqrt{n}$$

Donde:

t_{cal} = t calculado

m = Valor de las muestras analizadas

M = Valor asignado al MRC

σ = Desviación estándar absoluta

n =Número de lecturas o valores medidos

Para evaluar si hay diferencias significativas entre los valores medidos y el reportado se realizó la prueba t, en la cual si el $t_{cal} < t_{crit}$, indica que los valores no tienen diferencias significativas y son aceptables.

3.4.3 Límite de Detección (LOD). El LOD es la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba ⁷⁷. Para estimar el límite de detección se utilizó como blanco una muestra de harina blanca ya que esta tiene características físicas semejantes al material de estudio y su contenido en fibra es bajo. Se le determino la FDT. \bar{X} es el promedio de las muestras y σ la desviación estándar.

Ecuación 12: Límite de Detección

$$LOD = X + 3\sigma$$

3.4.4 Límite de Cuantificación (LOQ). El LOQ es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco ⁷⁷. Para estimar el límite de detección se utilizó el blanco y se le determinó la FDT.

Ecuación 13: Límite de cuantificación

$$LOQ = X + 10\sigma$$

3.5 FORMULACIÓN DE UN MATERIAL DE FIBRA DIETARIA

Se emplearon las harinas de la cáscara y el mucílago de uno de los clones estudiados, desarrollando un balance de masa con ellas, para obtener una mezcla de FD óptima para la formulación de un complemento para consumo humano.

4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LAS HARINAS DE LOS RESIDUOS DE CACAO

Los resultados obtenidos en la composición proximal, realizado a las harinas de los residuos de cacao estudiados se pueden apreciar en la tabla 8.

Tabla 8. Composición proximal de la harina de las cáscaras y mucílagos de cacao estudiados.

CLON		Humedad (g/100g BS)	Ceniza (g/100g BS)	Proteína (g/100g BS)	Fibra cruda (g/100g BS)	Grasa (g/100g BS)
Cáscara	CCN-51	9,97	7,47	5,42	20,87	0,42
	TSH-565	8,51	5,88	4,78	30,16	0,46
Mucílago*	CCN-51*	8,59	7,77	6,35	0,33	2,11
	TSH-56*	9,01	6,70	5,94	0,43	2,27

Fuente: Carreño y Rojas (2014) * las autoras. BS=base seca.

En ella se puede ver qué; en la cáscara, entre los dos clones la fibra cruda (FC) presenta una variación entre ellos, de igual manera se presenta esta variación para la fibra cruda en el mucílago de ambos clones. El residuo con la mayor cantidad de FC es la cáscara del TSH-565, seguido de la cáscara del CCN-51 y finalmente la menor cantidad de FC la tiene el mucílago del CCN-51. La fibra cruda se ve influenciada por la fuente y el grado de madurez de la planta ⁶⁴, el contenido de FC

en estos residuos sugiere la presencia de FD, los valores de FC no tienen relación con el verdadero contenido de FD ⁵⁰.

En la siguiente sección se va a presentar el cálculo de las figuras de mérito y el análisis de resultados de las muestras que fueron objeto de estudio (residuos de cáscara y mucílago de los clones de cacao CCN-51 y TSH-565).

4.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS DE MÉRITO

Para el análisis estadístico de los resultados se calculó el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variabilidad (CV), con los resultados de los parámetros medidos en cada fuente de fibra dietaria total.

4.2.1 Exactitud del método. Este valor es importante ya que expresa la cercanía del resultado al valor verdadero. Se determinó como sesgo, analizando el material de referencia certificado (MRC) descrito en el numeral 3.4.2. Los análisis se realizaron diez veces con su respectivo duplicado y los cálculos para determinar la exactitud se reportaron en la tabla 9.

Tabla 9. Exactitud del método.

Patrón de cacao					
% FDT (g/100g BS)	14,44	14,55	14,72	15,53	14,72
	15,53	14,69	15,29	14,38	15,39
PROMEDIO (g/100g BS)	VALOR TEORICO (g/100g BS)	n	σ	t_{cal}	t_{tab}
14,92	14,5	10	0.46	2,19	2,23

Fuente: Las autoras. n= número de datos, σ = desviación estándar, BS=base seca.

Como se puede observar en la tabla 9, al realizar la prueba t con un 95% de confianza, se obtuvo que la t calculada (t_{cal}), es menor que t tabulada (t_{tab}) (ver anexo A para el valor de t_{tab}), lo cual indica que no existen diferencias significativas entre los valores experimentales y el valor teórico, de lo que se concluye que el método es exacto. El porcentaje de error de los datos obtenidos en la tabla 9 se obtiene empleando la ecuación 14 y se encuentra a continuación:

Ecuación 14: Porcentaje de error

$$\%Error = \left| \frac{V_T - V_{exp}}{V_T} \right| * 100$$

$$\%Error = \left| \frac{14,50 - 14,92}{14,50} \right| * 100$$

$$\%Error = 2,89\%$$

4.2.2 Determinación del límite de detección para la FDT (LOD). En la tabla 10, se reportan los resultados para el límite de detección, el cual fue calculado utilizando la ecuación 12, establecida en la sección 3.4.3. El resultado es obtenido usando los datos de FDT de un conjunto de 6 repeticiones para la harina que es utilizada como el blanco. Se escogió este material debido a su parecido físico (harina) con los residuos de cacao que fueron prueba de estudio.

Tabla 10. LOD para el blanco, en el método enzimático-gravimétrico.

ANALITO	n	FDT (g/100g BS)		PROMEDIO (g/100g BS)	σ	CV	LOD (g/100g BS)
BLANCO (Harina)	6	0,94	0,93	0,93	0,01	1,43	0,97
		0,93	0,95				
		0,91	0,93				

Fuente: Las autoras. n= número de datos, σ = desviación estándar, CV= coeficiente de variación.

Ya que el LOD es la mínima cantidad de sustancia que puede ser detectada por el método; 0,97 g/100g BS representa la concentración mínima que se puede medir a la hora de desarrollar este análisis para las harinas. El límite de detección toma importancia muy marcada a la hora de determinar la cantidad de muestra a pesar antes de iniciar el análisis. Así, por ejemplo, para muestras con un contenido de fibra dietaria menor a $9,7 \times 10^{-3}$ g/g BS, la muestra mínima a pesar deberá ser superior o igual a 3 gramos; lo anterior con el fin de sobrepasar el umbral asociado con la detección del método.

4.2.3 Determinación del límite de cuantificación para la FDT (LOQ). En la tabla 11 se muestran los resultados para el límite de cuantificación, el cual fue calculado usando la ecuación 13, establecida en la sección 3.4.4. El resultado mostrado es obtenido usando los resultados obtenidos de un conjunto de 6 repeticiones del análisis de FDT para harina.

Tabla 11. LOQ para el blanco, en el método enzimático-gravimétrico.

ANALITO	n	FDT (g/100g BS)		PROMEDIO (g/100g BS)	σ	CV	LOQ (g/100g BS)
BLANCO (Harina)	6	0,94	0,93	0,93	0,01	1,43	1,06
		0,93	0,95				
		0,91	0,93				

Fuente: Autoras. σ = desviación estándar, CV= coeficiente de variabilidad

Ya que el LOQ se define como la magnitud mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud, 1,06 g/100g BS es la concentración mínima que debe tener el analito para expresar el resultado del análisis. En los resultados obtenidos para cada clon (tablas 12 y 13), se puede encontrar que los %FD son mayores a este LOQ.

4.2.4 Determinación de la precisión del método. Para la determinación de estos parámetros, se siguió lo establecido en la sección 3.4.1 y los resultados se reportan en las tablas 12 a la 15. Los datos obtenidos durante el análisis se muestran en los anexos B al E.

La tabla 12 y 13 muestra los datos de la precisión intermedia tanto para el residuo de cáscara como el residuo de mucílago respectivamente.

Tabla 12. Precisión intermedia de los porcentajes de FDS, FDI y FDT (como la suma de la FDS+FDI) para el residuo de cáscara de los dos clones CCN-51 y TSH-565. (Cada analista realizó 5 ensayos con su respectivo duplicado).

ANALISTA	ENSAJO	CÁSCARA CCN-51			CÁSCARA TSH-565		
		FDI	FDS	FDT	FDI	FDS	FDT
		(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)
1	1	53,26	7,97	61,23	47,67	6,89	54,56
	2	52,53	7,46	59,99	47,79	6,58	54,37
	3	52,99	7,42	60,41	48,31	6,27	54,58
	4	52,36	7,4	59,76	48,62	6,26	54,88
	5	52,13	7,31	59,44	48,19	6,16	54,35
2	6	52,16	7,96	60,12	48,63	6,1	54,74
	7	51,95	7,54	59,49	49,29	6,06	55,35
	8	52,89	7,8	60,69	47,79	6,24	54,03
	9	52,12	7,12	59,24	48,62	6,26	54,88
	10	51,87	7,81	59,68	49,06	6,1	55,16
PROMEDIO		52,43	7,58	60,01	48,4	6,29	54,69
DESVIACIÓN		0,48	0,29	0,62	0,97	0,09	0,39
CV		0,91	3,82	1,04	2,03	1,53	0,72

Fuente: Las autoras. BS= base seca

Tabla 13. Precisión intermedia de los porcentajes de FDS, FDI y FDT (como la suma de la FDS+FDI) para el residuo de mucílago de los dos clones CCN-51 y TSH-565. (Cada analista realizó 3 ensayos con su respectivo duplicado).

ANALISTA	ENSAYO	MUCÍLAGO CCN-51			MUCÍLAGO TSH-565		
		FDI	FDS	FDT	FDI	FDS	FDT
		(g/100g BS)	(g/100g BS)	(g/100g BS)	(g/100g BS)	(g/100g BS)	(g/100g BS)
1	1	4,83	12,29	17,13	2,64	12,40	15,05
	2	4,97	12,27	17,24	2,76	12,32	14,37
	3	4,72	12,88	17,59	2,56	12,58	14,84
2	4	4,96	13,55	17,52	2,53	12,57	15,10
	5	4,96	12,91	17,86	2,77	12,88	15,04
	6	4,99	12,99	17,99	2,66	12,79	15,15
PROMEDIO		4,91	12,81	17,56	2,65	12,59	14,93
DESVIACIÓN		0,11	0,48	0,34	0,10	0,22	0,29
CV		2,18	3,76	1,91	3,74	1,72	1,95

Fuente: Las autoras. BS= base seca

En estas tablas se observa que los coeficientes de variación (CV) son menores al 5%, por lo tanto, es posible decir que el método es preciso y que los resultados que se obtendrán al analizar otras muestras serán confiables. También se encuentra que la cáscara de ambos clones tiene una mayor cantidad de FDI, mientras que el mucílago presenta un porcentaje mayoritario en FDS.

En las tablas 14 y 15 se muestran los resultados de repetibilidad del método.

Tabla 14. Repetibilidad del método analista 1.

ANALISTA	ENSAJO	CÁSCARA CCN-51			CÁSCARA TSH-565		
		FDI	FDS	FDT	FDI	FDS	FDT
		(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)
1	1	53,26	7,97	61,23	47,67	6,89	54,56
	2	52,53	7,46	59,99	47,79	6,58	54,37
	3	52,99	7,42	60,41	48,31	6,27	54,58
	4	52,36	7,40	59,76	48,62	6,26	54,88
	5	52,13	7,31	59,44	48,19	6,16	54,35
PROMEDIO		52,65	7,51	60,17	48,12	6,43	54,55
DESVIACIÓN		0,46	0,26	0,69	0,39	0,30	0,21
CV		0,88	3,49	1,15	0,81	4,67	0,38
ANALISTA	ENSAJO	MUCÍLAGO CCN-51			MUCÍLAGO TSH-565		
		FDI	FDS	FDT	FDI	FDS	FDT
		(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)
1	1	4,83	12,29	17,13	2,64	12,40	15,05
	2	4,97	12,27	17,24	2,76	12,32	14,37
	3	4,72	12,88	17,59	2,56	12,58	14,84
PROMEDIO		4,91	12,48	17,39	2,53	12,43	14,76
DESVIACIÓN		0,07	0,34	0,35	0,10	0,13	0,34
CV		1,45	2,75	2,03	4,03	1,07	2,32

Fuente: Las autoras.

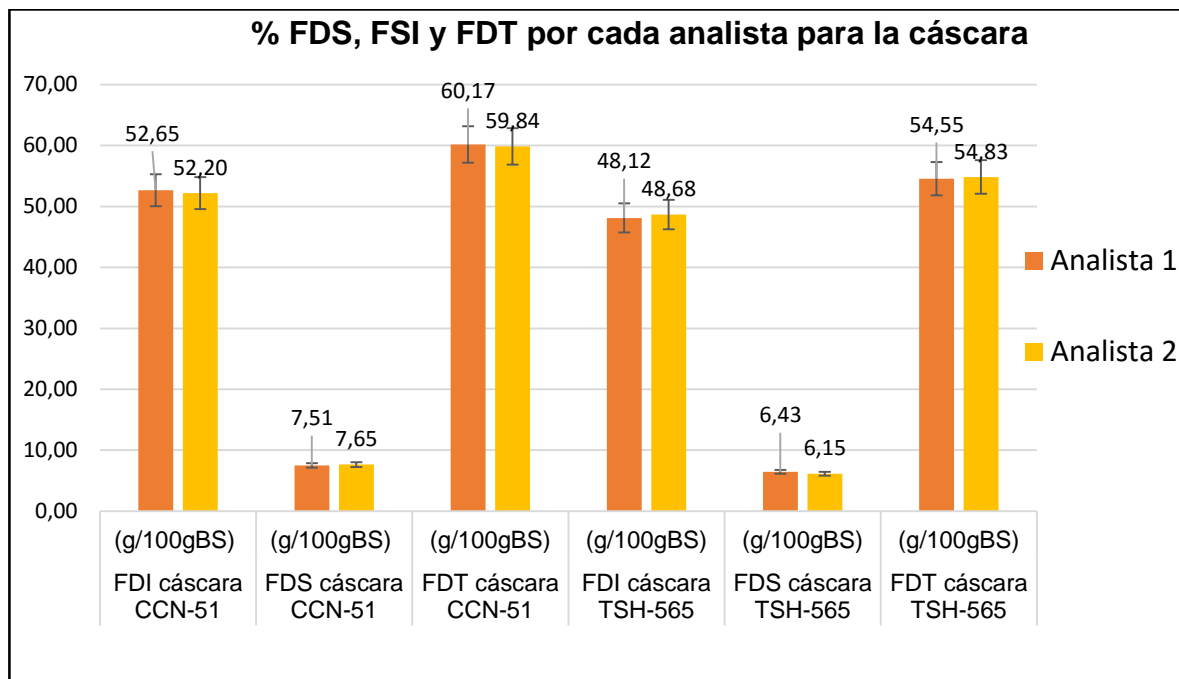
Tabla 15. Repetibilidad del método analista 2.

ANALISTA	ENSAYO	CÁSCARA CCN-51			CÁSCARA TSH-565		
		FDI	FDS	FDT	FDI	FDS	FDT
		(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)
2	1	52,16	7,96	60,12	48,63	6,10	54,74
	2	51,95	7,54	59,49	49,29	6,06	55,35
	3	52,89	7,8	60,69	47,79	6,24	54,03
	4	52,12	7,12	59,24	48,62	6,26	54,88
	5	51,87	7,81	59,68	49,06	6,10	55,16
PROMEDIO		52,20	7,65	59,84	48,68	6,15	54,83
DESVIACIÓN		0,41	0,33	0,57	0,57	0,09	0,51
CV		0,78	4,32	0,96	1,18	1,48	0,93
ANALISTA	ENSAYO	MUCÍLAGO CCN-51			MUCÍLAGO TSH-565		
		FDI	FDS	FDT	FDI	FDS	FDT
		(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)	(g/100gBS)
2	1	4,96	13,55	17,52	2,53	12,57	15,10
	2	4,96	12,91	17,86	2,77	12,88	15,04
	3	4,99	12,99	17,99	2,66	12,79	15,15
PROMEDIO		4,97	12,82	17,79	2,45	12,75	15,10
DESVIACIÓN		0,02	0,23	0,25	0,09	0,16	0,05
CV		0,46	1,83	1,40	3,51	1,25	0,33

Fuente: Las autoras.

En las tablas 14 y 15, se muestran los valores de porcentaje de fibra determinados por cada analista. Esta información se tabuló y se representa en la gráfica 1 y 2, en donde se puede observar que las determinaciones de los porcentajes de fibra no varían drásticamente entre analistas. Finalmente, se desarrolló un análisis ANOVA/TUKEY con una significancia estadística igual al 95% (ver resultados tabla 16 y 17 respectivamente); confirmándose que no existen diferencias significativas entre los valores reportados por los dos analistas. Los resultados anteriores indican que el método es repetible. Sin embargo, los resultados tabulados en la tabla muestran que, si hay diferencias significativas en los valores de FDI, FDS, FDT; entre clones.

Gráfica 1. Diferencias entre los % FDS, FDI y FDT, para la cáscara, por cada uno de los analistas.



Gráfica 2. Diferencias entre los % FDS, FDI y FDT, para el mucílago, por cada uno de los analistas.

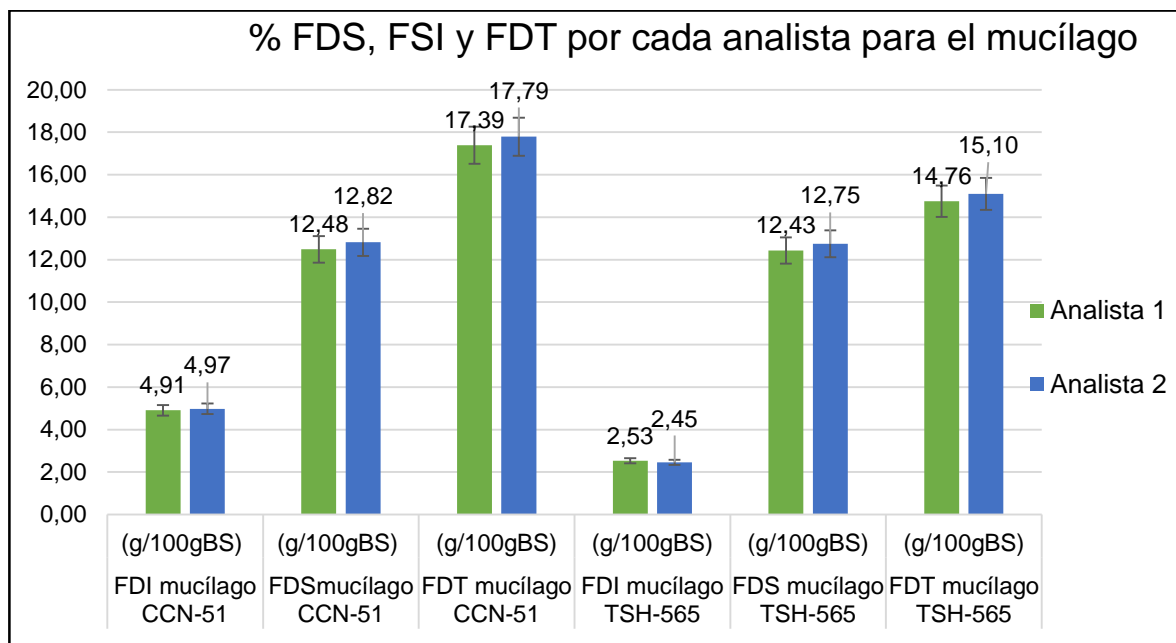


Tabla 16. Datos del análisis ANOVA para los resultados de FDS, FDI y FDT por cada analista.

CÁSCARA				MUCÍLAGO		
ANALISTA 1 Y 2	F	Valor crítico para F	Probabilidad	F	Valor crítico para F	Probabilidad
CCN-51 FDI	2,77	5,32	0,13	2,40	7,71	0,20
CCN-51 FDS	0,50	5,32	0,50	1,92	7,71	0,24
CCN-51 FDT	0,64	5,32	0,45	2,57	7,71	0,18
TSH-565 FDI	3,30	5,32	0,11	1,07	7,71	0,36
TSH-65 FDS	3,97	5,32	0,08	0,18	7,71	0,69
TSH-565 FDT	1,33	5,32	0,28	2,95	7,71	0,16

Tabla 17. Datos del análisis TUKEY para los resultados de FDS, FDI y FDT por cada analista.

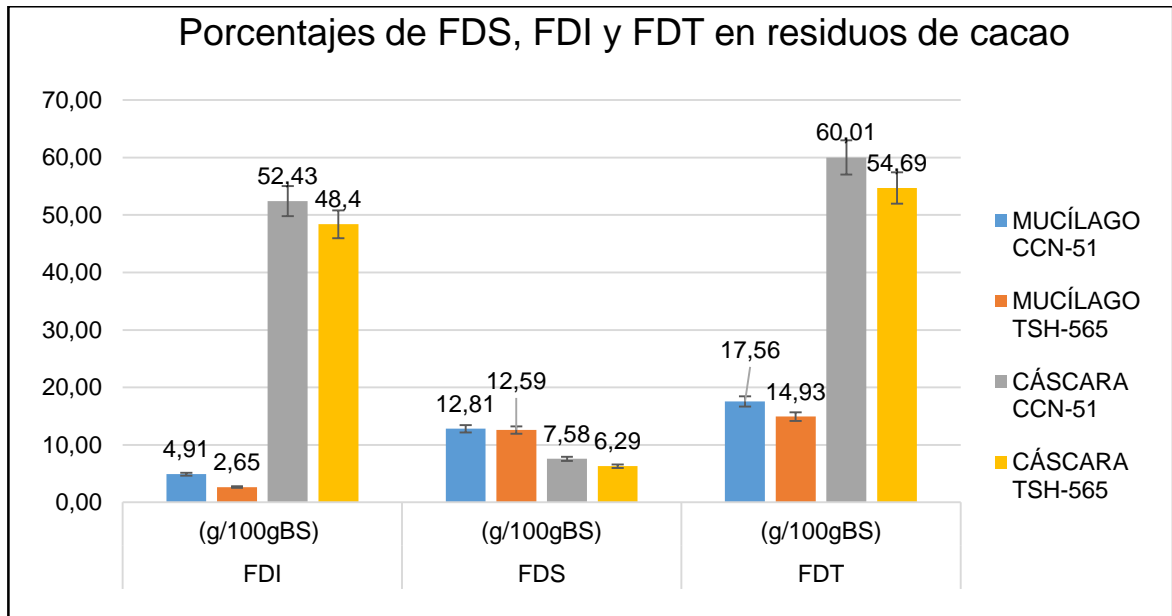
TUKEY analista 1				
	Significancia / Cascara		significancia / Mucílago	
	CCN-51	TSH-565	CCN-51	TSH-565
FDI	0,43 B	0,26 A	0,44 B	1,00 A
FDS	0,85 B	0,36 A	0,06 B	0,51 A
FDT	0,77 B	0,83 A	0,16 B	0,33 A
TUKEY analista 2				
	Significancia / Cascara		significancia / Mucílago	
	CCN-51	TSH-565	CCN-51	TSH-565
FDI	0,43 B	0,26 A	0,44 B	1,00 A
FDS	0,85 B	0,36 A	0,06 B	0,51 A
FDT	0,77 B	0,83 A	0,16 B	0,33 A

Fuente: Las autoras. Los valores con letras diferentes representan diferencias significativas según el análisis de Tukey.

4.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA FIBRA DIETARIA DE LOS CLONES ANALIZADOS

Los valores de FDI, FDS y FDT encontrados en cada uno de los residuos estudiados por el método enzimático-gravimétrico se muestran en la gráfica 3.

Gráfica 3.Contenido de FDS, FDI y FDT en residuos de cacao. Fuente: Las autoras.



A partir de los resultados mostrados en la gráfica 3 (tomados de la tabla 12 y 13), se aprecia que, para el caso del mucílago, los valores de FDS son mayores que los de FDI. Por otro lado, en la cáscara la proporción se invierte y en este residuo el contenido de FDI es mayor que el de FDS.

Adicionalmente, cuando se comparan los resultados obtenidos en este trabajo de FDS del mucílago y FDI de la cáscara; con los reportados por Aguilar¹⁰ y Abarca y colaboradores⁶⁴ (ver Tabla 18), se observa que los clones CCN-51 y TSH-565 tienen un menor contenido de estos analitos.

Tabla 18. Cuadro comparativo de los % FDS, FDI y FDT por diferentes estudios realizados en cacao.

Trabajo	MUCÍLAGO			CÁSCARA		
	FDI (g/100g BS)	FDS (g/100g BS)	FDT (g/100g BS)	FDI (g/100g BS)	FDS (g/100g BS)	FDT (g/100g BS)
Aguilar (2011)	-	-	-	56,82	3,08	59,9
	-	-	-	64,06	2,35	66,57
Abarca y colaboradores (2010)	0,95	16,57	20,48	59,74	4,74	64,92
	0,84	19,76	20,52	60,79	3,3	64,09
Este estudio CCN-51*	4,83	12,48	17,31	51,84	7,58	59,42
Este estudio TSH-565*	2,38	12,54	14,92	48,39	6,29	54,69

Fuente: * las autoras.

Una posible explicación para este comportamiento puede estar asociada con los genotipos evaluados; así por ejemplo el clon de cacao CCN-51 es un cruce de variedades trinitario-criollo-forastero; mientras que los materiales con los cuales se compararon los resultados aquí obtenidos pertenecen a variedades trinitarias.

En la tabla 19, se pueden apreciar la comparación de los contenidos de FDT determinados según la metodología explicada en el numeral 3.3.4.1 y los obtenidos como la suma de la FDS y FDI.

Tabla 19. Comparación de la FDT determinada para cada residuo, con la FDS+FDI para los clones de CCN-51 y TSH-565.

ENSAYO	MUCÍLAGO			
	FDT TSH-565 (g/100g BS)	FDS+FDI TSH-565 (g/100g BS)	FDT CCN-51 (g/100g BS)	FDS+FDI CCN-51 (g/100g BS)
PROMEDIO	18,02	14,93	20,75	17,56
DESVIACIÓN	0,38	0,29	0,34	0,34
CV	2,08	1,95	1,63	1,91
ENSAYO	CÁSCARA			
	FDT TSH-565 (g/100g BS)	FDS+FDI TSH-565 (g/100g BS)	FDT CCN-51 (g/100g BS)	FDS+FDI CCN-51 (g/100g BS)
PROMEDIO	60,97	54,69	65,44	60,01
DESVIACIÓN	0,86	0,39	0,87	0,62
CV	1,41	0,72	1,32	1,04

Fuente: Las autoras. BS= base seca.

Estos análisis se trabajaron bajo las mismas condiciones que la determinación de FDS y FDI, por ende, la suma de la FDS y FDI debería coincidir con el resultado de la FDT determinada, ya que se trata de la misma muestra. Se observa una diferencia promedio de 5,86 para la cáscara y 3,14 para el mucílago; puntos porcentuales entre los resultados comparados. La diferencia puede estar asociada con las fluctuaciones en tiempos y temperaturas de incubación entre el análisis de la FDT y el de la FDS y la FDI; o en la fase de precipitación ⁵³.

En la tabla 20, se muestran los resultados del análisis ANOVA para cada una de las relaciones entre cáscara-cáscara y mucílago-mucílago de los dos clones estudiados.

Tabla 20. Datos del análisis ANOVA para los resultados de FDT para cada clon.

RESIDUO		F	F _{crit.}
FDT	MUCÍLAGO	177,03	4,96
	CÁSCARA	134,48	4,41

Fuente: Las autoras.

En el análisis ANOVA realizado por el software SPSS, para comparar las desviaciones estándar, con un 95% de nivel de confianza, se obtienen los valores de F y F_{crit} de la Tabla 18. Se puede observar que F es mayor que F_{crit} por lo tanto se puede decir que los datos comparados (mucílago-mucílago y cáscara-cáscara) son diferentes significativamente.

4.4 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN FDI:FDS EN RESIDUOS DE CACAO (CÁSCARAS Y MUCÍLAGOS)

En la tabla 21 se muestran los resultados de FDS, FDI y FDT y se hace la relación de la FDI:FDS, para cada uno de los residuos analizados de los clones de CCN-51 y TSH-565.

Tabla 21. Contenido de FDS, FDI, FDT y la relación de FDI:FDS en los residuos de cacao analizados.

ENSAYO	FDI (g/100g BS)	FDS (g/100g BS)	FDT (g/100g BS)	FDI:FDS
Cáscara CCN-51	51,84	7,57	59,42	6,84:1
Cáscara TSH-565	48,39	6,29	54,69	7,69:1
Mucílago CCN-51	4,83	12,48	17,31	0,38:1
Mucílago TSH-565	2,38	12,54	14,92	0,19:1

Fuente: las autoras. BS=base seca

De manera general, ninguno de los residuos caracterizados cumplen con la relación de FDI:FDS igual a 3:1; la cual es la aceptada por la OMS para ser incorporada en alimentos destinados al consumo humano.

En lo que respecta a la cáscara, la relación FDI:FDS obtenida fluctúa entre 6,84:1 a 7,69:1. Estos resultados elevados pueden estar asociados con el hecho que la relación de la FDI está influenciada por la ubicación del tejido en el fruto, siendo menor en la parte interna y aumentando gradualmente hacia el exterior⁴⁹. Pasando al mucílago, la relación FDI:FDS, fluctuó entre 0,19:1 y 0,38:1.

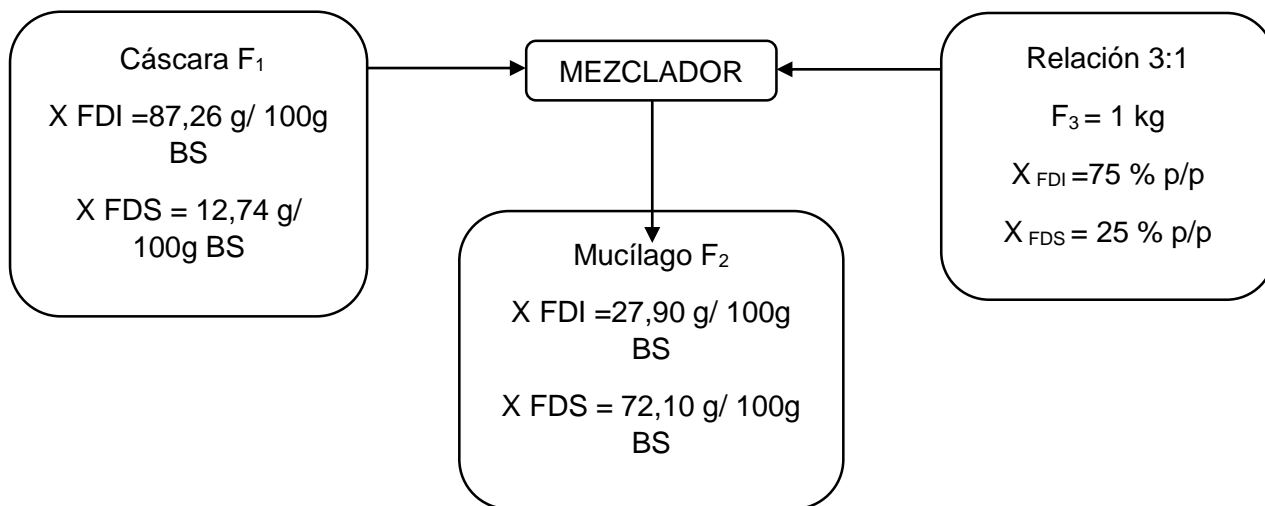
Así mismo, las diferencias de FDT existentes en la cáscara y en el mucílago; y entre sus fracciones de FDI y FDS, pueden estar asociadas con condiciones de crecimiento, edad del cultivo, ambiente. Por ejemplo, para mazorcas verdes los contenidos de hemicelulosa y pectina serán mayores que los de celulosa y lignina; esta situación se invierte a medida que la maduración tiene lugar⁴⁹.

4.5 OBTENCIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE FIBRA DIETARIA UTILIZANDO LOS RESIDUOS ESTUDIADOS

Los residuos estudiados (cáscara y mucílago) no cumplen con la relación de 3:1 para considerarse buenas fuentes de fibra, pero entre los resultados obtenidos se tiene que la cáscara del cacao es más rica en FDI, mientras que el mucílago es más rico en FDS. Teniendo en cuenta lo anterior se pueden emplear estos residuos para realizar mezclas entre las harinas de las cáscaras y las harinas del mucílago de cada clon para obtener la relación 3:1 y de tal manera aprovechar estos residuos.

Se realizó un balance de masa para saber las proporciones requeridas de cada una de las partes (cáscara y mucílago), para la obtención de un producto con una proporción de FDI:FDS de 3:1.

Se tomó como ejemplo el clon CCN-51, se llevan los % de FDS y FDI al 100%.



$$F_1 + F_2 = 1 \text{ kg}$$

$$0,8726 F_1 + 0,2790 F_2 = 0,75$$

$$F_1 = 1 - F_2$$

$$\begin{aligned} 0,8726(1 - F_2) + 0,2790 F_2 &= 0,75 \\ 0,8726 - 0,8726 F_2 + 0,2790 F_2 &= 0,75 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 0,8726 - 0,8726 F_2 + 0,2790 F_2 &= 0,75 \\ 0,8726 - 1,1516 F_2 &= 0,75 \end{aligned}$$

$$-0,5936 F_2 = -0,1226$$

$$F_2 = 0,2065 \text{ kg}$$

$$F_1 = 0,7935 \text{ kg}$$

Se obtuvo que la mezcla de los materiales para obtener 1 kg de fibra dietaria con relación 3:1; es: 0,2065 kg de harina del mucílago y 0,7935 kg de harina de la cáscara. Esto favorece un poco más el estudio ya que el mucílago es el residuo del que menos se tiene cantidad y es del que menos se necesita.

5 CONCLUSIONES

- Se determinó con un intervalo de confianza del 95% que el método implementado es exacto. De manera general, el porcentaje error promedio de FDT calculado con base en el material de referencia fue de 0,29%.
- Se confirmó que cada uno de las figuras de mérito evaluadas cumplen con los criterios estadísticos, concluyéndose que el método exacto, preciso y reproducible.
- A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que la cáscara de cacao contiene mayor cantidad de FDI (Entre 48,40 – 52,43 g/100g BS) y el mucílago contiene mayor cantidad de FDS (Entre 12,59 – 12,81 g/100g BS).
- Con relación a la FDI:FDS, se determinó que la cáscara y el mucílago de ambos clones, por separado, no cumple con la relación recomendada por la OMS para ser usadas como ingrediente en la formulación de alimentos. Sin embargo, planteando un balance de materia fue posible determinar las cantidades de harina de cáscara 0,79 kg y harina de mucílago 0,21kg, necesarias para obtener una mezcla con una relación 3:1, la cual es deseada para formulaciones alimentarias.

6 RECOMENDACIONES

- Determinar las fracciones de fibra dietaria soluble e insoluble del material de referencia certificado usado.
- Determinar el contenido de fibra dietaria (FDT, FDS y FDI) de un material de referencia secundario.
- La etapa de filtrado en la cuantificación de la fibra dietaria total, soluble e insoluble de las muestras debe realizarse en caliente para disminuir el tiempo de filtrado.
- Hacer un análisis de los componentes presentes en la parte de fibra dietaria soluble e insoluble, para corroborar que si se trata de cada una de las fracciones de la fibra dietaria.
- Analizar experimentalmente la mezcla obtenida del balance de materia con el fin de confirmar que se obtuvo una relación 3:1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BATISTA, L. *Guía técnica el cultivo de cacao*. (CEDAF, 2009).
2. VALENZUELA, J. F., Fernández, J. A., Restrepo, A., Puerta Restrepo, A. & Mejía Aristizabal, R. el cultivo de cacao. Compañía Nacional de Chocolates. (2012).
3. SEVILLA, J. M. O. La elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica. *Téc. Ind.* 46–51 (2007).
4. CUÉLLAR, O. & Guerrero, G. Antibacterial activity of the cacao bean husk, *Theobroma cacao* L. *Rev. MVZ Córdoba* 17, 3176–3183 (2012).
5. BAENA, L. & García, N. Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarillas de las semillas tostadas de *Theobroma cacao* L. de una industria chocolatera colombiana. 1–64 (2012).
6. GUTIÉRREZ, E.-L., Medina, G.-B., Roman, M.-O., Florez, O.-A. & Martínez, O.-L. Obtención y cuantificación de fibra dietaria a partir de residuos de algunas frutas comunes en Colombia. *Revista de la facultad de química farmacéutica* 9, 5–14 (2002).
7. MATEOS-Aparicio Cediél, I., Villanueva Suárez, M. J., Redondo Cuenca, A. & E-libro, C. Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de ingredientes funcionales Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria. (Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, 2008).
8. ARGÜELLO, O. & Mejía, L. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. *CORPOICA Corp. Colomb. Agric. Ganad. Bucaramanga Colomb.* 123–142 (2000).
9. CAÑAS Ángel, Z., Restrepo Molina, D. A. & Cortés Rodríguez, M. Revisión: Productos Vegetales como Fuente de Fibra Dietaria en la Industria de Alimentos. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 64, 6023–6035 (2011).
10. AGUILAR-Cárdenas, P.-I. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA FIBRA DIETARIA DE LA CÁSCARA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L) variedad Complejo nacional por trinitario. (Escuela de bioquímica y farmacia. Universidad técnica particular de Loja, 2011).
11. SAURA, F. D., Martín, C., Pulido, R. & Cambrodón, I. G. Fibra dietética en cerveza; contenido, composición y evaluación nutricional (2ª parte y final). *Cerveza Malta* 61–68 (2003).
12. GRAY, J. & ILSI Europe. *Dietary fibre: definition, analysis, physiology & health*. (ILSI Europe, 2006).
13. RODRÍGUEZ, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R. & Heredia, A. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 3–15 (2006).

14. ORTIZ, N. E. P. Obtención de fibra cruda para consumo humano a partir de la cascara de cacao tostado. *Publicaciones E Investigacion*. 4, 43–52 (2010).
15. SUÁREZ, J. & Hernández, F. A. *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. (2010).
16. ARBOLEDA-Echavarría, R. (Ricardo) & González-Vásquez, A. (Alejandro). Análisis socioeconómico del sector cacaoero colombiano. (2014).
17. SUÁREZ-Rozo, D.-L. & Orozco-Giraldo, D.-M. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao del theobroma cacao L., subproducto de una industria chocolatera nacional. (Universidad Tecnológica de Pereira, 2014).
18. GIRÓN, C., Tortolero, J., Hermoso, D. & González, I. Efecto de diferentes residuos vegetales en la compostación de cáscaras de cacao. *Agron. Trop*. 51, 549–562 (2001).
19. CARREÑO, T, O., J. & Rojas, C, L., Y. Determinación y ajuste de parámetros cinéticos de la extracción de polifenoles totales a partir de la cáscara de cacao. (Universidad Industrial de Santander, 2014).
20. GÓMEZ-Juaristi, M. *et al.* Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutr. Hosp*. 26, 289–292 (2011).
21. FRAGA, C. G. *et al.* Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clin. Dev. Immunol*. 12, 11–17 (2005).
22. OGATA, N. El cacao. *Biodiversistas* 72, 1–5 (2007).
23. CONABIO. Theobroma cacao L. *Species Plant*. 2 253–258 (1753).
24. BRAVO Ramírez, D. C. Evaluación fisicoquímica del comportamiento de las Almendras de Cacao (Theobroma Cacao l) de Seis Clones: ICS-1 (Imperial Collage Selection), ICS-95 (Imperial Collage Selection), UF-613 (United Fruit), IMC-67 (Iquitos Marañón Colección), TSH-565 (Trinidad Selection Hybrida), CCN-51 (Colección Castro Naranjal) y el Cacao Criollo durante el proceso de fermentación y secado. (2010).
25. LOPEZ G., Luis, Toro U., Said & Estupiñan A., Mauren. Cocoa Husk as Source of Natural Phenolic Antioxidants: Comparison of Polyphenols and Antioxidant Activiy in Theobroma Cacao Beans and Husk. *Colombia, Revista Facultad Nacional De Agronomía - Medellín* 67, 664–668 (2014).
26. PADRÓN-gamboa, G. *et al.* Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola. Propiedades físicas y de biodegradabilidad. *Rev Soc Quím Méx* 48, 156–164 (2004).
27. Fermentación especial Clon CCN-51 : Disponible en: <http://www.canacacao.org/contenido.item.50/fermentaci%F3n-especial-clon-ccn-51.html>. (Acceso: 13th October 2016)
28. ESTUPIÑAN A., Mauren R. IMPACTO DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y SECADO SOBRE LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD

- ANTIOXIDANTE DEL CLON DE CACAO CCN-51: ESTUDIO CUANTITATIVO PRELIMINAR. (Universidad Industrial de Santander, 2013).
29. GONZÁLEZ-ortiz, C. & Jaimes-Jaimes, M. Desarrollo experimental del proceso para la obtención de jugo derivado del mucilago de cacao. (Universidad Industrial de Santander, 2005).
 30. OCHOA-Garcia, O. E., Infante, R. B. & Rivera, C. J. Hacia una definición de fibra alimentaria. *Anales Venezolanos de Nutrición* 21, 25–30 (2008).
 31. BATISTA, S. M. de M. Efeito da fibra da farinha da casca de banana nanica (musa cavendiskii) na glicemia de ratos normais e diabeticos. (1995).
 32. MONTUFAR Leyva, K. & Dublan Garcia, O. 'FIBRAS DIETARIAS Y SU APLICACIÓN EN EL DESARROLLO TECNOLÓGICO DE PRODUCTOS ALIMENTARIOS COMO ALTERNATIVA DE ALIMENTOS FUNCIONALES'. (Universidad autónoma del estado de México, 2014).
 33. ESCUDERO-Álvarez, E. & González-Sánchez, P. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* 21, 61–72 (2006).
 34. CANO, I., Capetillo, M., Cardenas, M., Carrillo, R., Cartes, D. Rol de la fibra dietaria en animales no rumiantes. *Univ. Chile* (2009).
 35. CHAMORRO, R. A. M. & Mamani, E. C. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. *Rev. Investig. En Cienc. Tecnol. Aliment.* 1, (2015).
 36. OLAGNERO, G. *et al.* Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta* 25, 20–33 (2007).
 37. *Resolución Número 333 de 2011.*
 38. VOET, D. & Voet, J. G. Fundamentos de la bioquímica: La vida a nivel molecular. *Ed Médica Panam.* 217 (2007).
 39. MELO, V. & Cuamatzi, O. *Bioquímica de los procesos metabólicos.* (Reverte, 2007).
 40. RIERA, J. B. *Química y bioquímica de los alimentos II.* (Edicions Universitat Barcelona, 2004).
 41. ZAMORA, A. *Carbohidratos o Glúcidos, Estructura Química.* (Disponible en: <http://www.scientificsyhich.com/fitness/carbohidratos2.html>.(Acceso: 17 agosto , 2014).
 42. YÚFERA, E. P. *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria.* 2, (Reverté, 1995).
 43. YANGILAR, F. The Application of Dietary Fibre in Food Industry: Structural Features, Effects on Health and Definition, Obtaining and Analysis of Dietary Fibre: A Review. *J. Food Nutr. Res.* 1, 13–23 (2013).
 44. TROWELL, H. Dietary fibre, ischaemic heart disease and diabetes mellitus. *Proc. Nutr. Soc.* 32, 151–157 (1973).
 45. TROWELL, H. C. Dietary-fiber hypothesis of the etiology of diabetes mellitus. *Diabetes* 24, 762–765 (1975).

46. BURKITT, D. P. Epidemiology of large bowel disease: the role of fibre. *Proc. Nutr. Soc.* 32, 145–149 (1973).
47. DUARTE, P. R., Baranzini, R. & Lourdes, A. Fiber from fruits, vegetables and cereals: A function of health. *Revista mexicana de agronegocios* 23, 613–621 (2008).
48. FIGUEROLA, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I. & Asenjo, F. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chem.* 91, 395–401 (2005).
49. ABARCA, Rojas, D., Hernan. Identificación de fibra dietaria en residuos de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad complejo nacional por trinitario. *Esc. Ing. EN Ind. Agropecu. ÁREA BIOLÓGICA Univ. Téc. Part. LOJA LOJA–ECUADOR* (2010).
50. PAK, N. in *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición* 177–188 (FAO. Direccion de Alimentacion y Nutricion. Cap 16, 1997).
51. SLAVIN, J. L. Dietary fiber: classification, chemical analyses, and food sources. *J. Am. Diet. Assoc.* 87, 1164–1171 (1987).
52. GOERING, H. K. & Van Soest, P. J. Forage fiber analysis. Agricultural handbook no. 379. *US Dep. Agric. Wash. DC* 1–20 (1970).
53. GROSSI, G. V. & Ohaco, E. H. DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL, SOLUBLE E INSOLUBLE EN HONGOS COMESTIBLES DE CULTIVO *Pleurotus ostreatus*.
54. LI, B. W. & Cardozo, M. S. Nonenzymatic-gravimetric determination of total dietary fiber in fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* 75, 372–374 (1992).
55. SOUTHGATE, D. A. T. Determination of carbohydrates in foods II. Unavailable carbohydrates. *J. Sci. Food Agric.* 20, 331–335 (1969).
56. SELVENDRAN, R. R., Pont, S. & Du, M. Simplified methods for the preparation and analysis of dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* 31, 1173–1182 (1980).
57. ROURE, R. B. Efectos metabólico-terapéuticos a corto y largo plazo de la suplementación con fibra dietética. (Universitat Rovira i Virgili, 2007).
58. SILVA Montoya, D. A. Documentación y estandarización de la técnica para la determinación de fibra en productos alimenticios para el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. (Universidad Tecnológica de Pereira, 2007).
59. ASP, N. G., Johansson, C. G., Hallmer, H. & Siljestroem, M. Rapid enzymic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 31, 476–482 (1983).
60. GUADARRAMA, A., Orozco, J. & Morales, M. *Obtención de α -amilasa a partir de *Aspergillus oryzae* XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* (Universidad Autónoma del Estado de México).
61. CIENFUEGOS, A. Series: from physiology to the clinic: Gastric secretion and proton pump inhibitors. *Rev. Colomb. Gastroenterol.* 25, 94–98 (2010).

62. IKRAM-ul-Haq, Shahida, J. & Hamad, A. Production of Amyloglucosidase by UV Irradiated Strain *Aspergillus Niger* Using Solid States Fermentation Food Technology. *Biotechnology* 3, 34–39 (2002).
63. MALIK, S., Iftikhar, T. & Haq, I. U. Enhanced amyloglucosidase biosynthesis through mutagenesis using *Aspergillus niger*. *Pak J Bot* 43, 111–119 (2011).
64. ABARCA, D., Martínez, R., Muñoz, J. J., Torres, M. P. & Vargas, G. Residuos de café, cacao y cladodio de tuna: Fuentes promisorias de fibra dietaria. *Rev. Tecnológica-ESPOL* 23, (2010).
65. MARTÍN-Cabrejas, M. A., Valiente, C., Esteban, R. M., Mollá, E. & Waldron, K. Cocoa hull: a potential source of dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* 66, 307–311 (1994).
66. LECUMBERRI, E. *et al.* [Characterization of cocoa fiber and its effect on the antioxidant capacity of serum in rats]. *Nutr. Hosp.* 21, 622–628 (2006).
67. LECUMBERRI, E. *et al.* Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem.* 104, 948–954 (2007).
68. CĂPRIȚĂ, R. & Căpriță, A. Chemical methods for the determination of soluble and insoluble non-starch polysaccharides-review. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 44, 73–80 (2011).
69. SCHLEICHER, R. L. Standard Reference Material® 2384. Baking Chocolate. *Natl. Inst. Stand. Technol.* 1–8 (2015).
70. HORWITZ, W. & Latimer, G. W. *Official methods of analysis of AOAC International.* (2005).
71. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume II, Section 45.4.07, Method 985.29 (1997).
72. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume II, Section 45.4.08, Method 993.19 (1997).
73. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume II, Section 32.1.16, Method 991.42 (1997).
74. PAK, N. La fibra dietética en la alimentación humana, importancia en la salud. in *Anales de la Universidad de Chile N°11* (2000).
75. MILLER J. *Estadística para Química analítica.*
76. HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.* 54, 67A–76A (1982).
77. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. (LGC, 1998).

BIBLIOGRAFÍA

ABARCA, D., Martínez, R., Muñoz, J. J., Torres, M. P. & Vargas, G. Residuos de café, cacao y cladodio de tuna: Fuentes promisorias de fibra dietaria. Rev. Tecnológica-ESPOL 23, (2010).

ABARCA, Rojas, D., Hernan. Identificación de fibra dietaria en residuos de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad complejo nacional por trinitario. Esc. Ing. EN Ind. Agropecu. ÁREA BIOLÓGICA Univ. Téc. Part. LOJA LOJA-ECUADOR (2010).

AGUILAR-Cárdenas, P.-I. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA FIBRA DIETARIA DE LA CÁSCARA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L) variedad Complejo nacional por trinitario. (Escuela de bioquímica y farmacia. Universidad técnica particular de Loja, 2011).

ASP, N. G., Johansson, C. G., Hallmer, H. & Siljestroem, M. Rapid enzymic assay of insoluble and soluble dietary fiber. J. Agric. Food Chem. 31, 476-482 (1983).

BAENA, L. & García, N. Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarillas de las semillas tostadas de *Theobroma cacao* L. de una industria chocolatera colombiana. 1-64 (2012).

BRAVO Ramírez, D. C. Evaluación fisicoquímica del comportamiento de las Almendras de Cacao (*Theobroma Cacao* l) de Seis Clones: ICS-1 (Imperial Collage Selection), ICS-95 (Imperial Collage Selection), UF-613 (United Fruit), IMC-67 (Iquitos Marañoń Colection), TSH-565 (Trinidad Selection Hybrid), CCN-51 (Colección Castro Naranja) y el Cacao Criollo durante el proceso de fermentación y secado. (2010).

BURKITT, D. P. Epidemiology of large bowel disease: the role of fibre. Proc. Nutr. Soc. 32, 145-149 (1973).

CĂPRIȚĂ, R. & Căpriță A. Chemical methods for the determination of soluble and insoluble non-starch polysaccharides-review. Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol. 44, 73-80 (2011).

CANO, I., Capetillo, M., Cardenas, M., Carrillo, R., Cartes, D. Rol de la fibra dietaria en animales no rumiantes. Univ. Chile (2009).

CAÑAS Ángel, Z., Restrepo Molina, D. A. & Cortés Rodríguez, M. Revisión: Productos Vegetales como Fuente de Fibra Dietaria en la Industria de Alimentos. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 64, 6023-6035 (2011).

CARREÑO, T, O., J. & Rojas, C, L., Y. Determinación y ajuste de parámetros cinéticos de la extracción de polifenoles totales a partir de la cáscara de cacao. (Universidad Industrial de Santander, 2014).

CHAMORRO, R. A. M. & Mamani, E. C. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. Rev. Investig. En Cienc. Tecnol. Aliment. 1, (2015).

CUÉLLAR, O. & Guerrero, G. Antibacterial activity of the cacao bean husk, *Theobroma cacao* L. Rev. MVZ Córdoba 17, 3176-3183 (2012).

ESCUADERO-Álvarez, E. & González-Sánchez, P. La fibra dietética. Nutr. Hosp. 21, 61-72 (2006).

ESTUPIÑAN A., Mauren R. IMPACTO DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y SECADO SOBRE LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL CLON DE CACAO CCN-51: ESTUDIO CUANTITATIVO PRELIMINAR. (Universidad Industrial de Santander, 2013).

GROSSI, G. V. & Ohaco, E. H. DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL, SOLUBLE E INSOLUBLE EN HONGOS COMESTIBLES DE CULTIVO *Pleurotus ostreatus*.

HORWITZ, W. & Latimer, G. W. Official methods of analysis of AOAC International. (2005).

LECUMBERRI, E. et al. [Characterization of cocoa fiber and its effect on the antioxidant capacity of serum in rats]. Nutr. Hosp. 21, 622-628 (2006).

LECUMBERRI, E. et al. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). Food Chem. 104, 948-954 (2007).

LOPEZ G., Luis, Toro U., Said & Estupiñan A., Mauren. Cocoa Husk as Source of Natural Phenolic Antioxidants: Comparison of Polyphenols and Antioxidant Activity in *Theobroma Cacao* Beans and Husk. Colombia, Revista Facultad Nacional De Agronomía - Medellín 67, 664-668 (2014).

MONTUFAR Leyva, K. & Dublan Garcia, O. 'FIBRAS DIETARIAS Y SU APLICACIÓN EN EL DESARROLLO TECNOLÓGICO DE PRODUCTOS ALIMENTARIOS COMO ALTERNATIVA DE ALIMENTOS FUNCIONALES'. (Universidad autónoma del estado de México, 2014).

OCHOA-Garcia, O. E., Infante, R. B. & Rivera, C. J. Hacia una definición de fibra alimentaria. Anales Venezolanos de Nutrición 21, 25-30 (2008).

OGATA, N. El cacao. Biodiversistas 72, 1-5 (2007).

ORTIZ, N. E. P. Obtención de fibra cruda para consumo humano a partir de la cascara de cacao tostado. Publicaciones E Investigacion. 4, 43-52 (2010).

PAK, N. in Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición 177-188 (FAO. Dirección de Alimentación y Nutrición. Cap 16, 1997).

SUÁREZ-Rozo, D.-L. & Orozco-Giraldo, D.-M. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao del theobroma cacao L., subproducto de una industria chocolatera nacional. (Universidad Tecnológica de Pereira, 2014).

TROWELL, H. C. Dietary-fiber hypothesis of the etiology of diabetes mellitus. *Diabetes* 24, 762-765 (1975).

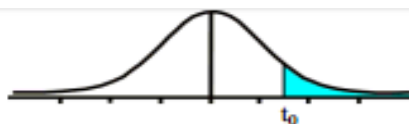
TROWELL, H. Dietary fibre, ischaemic heart disease and diabetes mellitus. *Proc. Nutr. Soc.* 32, 151-157 (1973).

YANGILAR, F. The Application of Dietary Fibre in Food Industry: Structural Features, Effects on Health and Definition, Obtaining and Analysis of Dietary Fibre: A Review. *J. Food Nutr. Res.* 1, 13-23 (2013).

ANEXOS

Anexo A. Tabla T-student.

Tabla t-Student



Grados de libertad	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
13	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
14	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
15	0.6912	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467
16	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
17	0.6892	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982
18	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
19	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
20	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
21	0.6864	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314
22	0.6858	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188
23	0.6853	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073
24	0.6848	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970
25	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
26	0.6840	1.3150	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787
27	0.6837	1.3137	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707
28	0.6834	1.3125	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633
29	0.6830	1.3114	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564
30	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500
31	0.6825	1.3095	1.6955	2.0395	2.4528	2.7440
32	0.6822	1.3086	1.6939	2.0369	2.4487	2.7385
33	0.6820	1.3077	1.6924	2.0345	2.4448	2.7333
34	0.6818	1.3070	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284
35	0.6816	1.3062	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238
36	0.6814	1.3055	1.6883	2.0281	2.4345	2.7195
37	0.6812	1.3049	1.6871	2.0262	2.4314	2.7154
38	0.6810	1.3042	1.6860	2.0244	2.4286	2.7116
39	0.6808	1.3036	1.6849	2.0227	2.4258	2.7079
40	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
41	0.6805	1.3025	1.6829	2.0195	2.4208	2.7012
42	0.6804	1.3020	1.6820	2.0181	2.4185	2.6981
43	0.6802	1.3016	1.6811	2.0167	2.4163	2.6951
44	0.6801	1.3011	1.6802	2.0154	2.4141	2.6923
45	0.6800	1.3007	1.6794	2.0141	2.4121	2.6896
46	0.6799	1.3002	1.6787	2.0129	2.4102	2.6870
47	0.6797	1.2998	1.6779	2.0117	2.4083	2.6846
48	0.6796	1.2994	1.6772	2.0106	2.4066	2.6822
49	0.6795	1.2991	1.6766	2.0096	2.4049	2.6800

Anexo B. Resultados para la cáscara del TSH-565.

NÚMERO MUESTRA	CÁSCARA TSH-565											PROMEDIO RESIDUO g	g CENIZA	g PROTEÍNA
	FIBRA INSOLUBLE					FIBRA SOLUBLE								
	MUESTRA g	PAPEL SOLO g	PAPEL MUESTRA SECA g	RESIDUO g	PROMEDIO RESIDUO g	PAPEL SOLO g	PAPEL MUESTRA SECA g	RESIDUO g	PROMEDIO RESIDUO g	PAPEL SOLO g	PROMEDIO RESIDUO g			
1	1,0012	0,8690	1,3748	0,5068	0,4997	0,9095	1,0203	0,1074	0,1081	0,0810	0,0128			
2	1,0015	0,8767	1,3703	0,4986	0,4999	0,8967	1,0054	0,1087	0,1074	0,0185	0,0356			
3	1,0011	0,8902	1,3919	0,5017	0,5007	0,8777	0,9892	0,1115	0,1092	0,0346	0,0124			
4	1,0013	0,9035	1,4016	0,4981	0,5008	0,9101	1,0376	0,1033	0,1108	0,0172	0,0361			
5	1,0011	0,8712	1,3721	0,5009	0,4958	0,8829	0,9936	0,1107	0,1095	0,0884	0,0121			
6	1,0013	0,8918	1,3922	0,5004	0,5052	0,8937	1,0013	0,1076	0,1117	0,0135	0,0357			
7	1,0014	0,8891	1,3988	0,5097	0,5071	0,8838	0,9957	0,1119	0,1074	0,0896	0,0126			
8	1,0018	0,8749	1,3728	0,4979	0,5071	0,8782	0,9878	0,1096	0,1097	0,0133	0,0361			
9	1,0004	0,8659	1,3515	0,4856	0,4958	0,8888	1,0032	0,1144	0,1095	0,0885	0,0135			
10	1,0005	0,9042	1,4101	0,5059	0,5052	0,9030	1,0076	0,1046	0,1117	0,0115	0,0343			
11	1,0008	0,8708	1,3730	0,5022	0,5071	0,8828	0,9821	0,0993	0,1097	0,0417	0,0130			
12	1,0011	0,8879	1,3961	0,5082	0,5071	0,9016	1,0257	0,1241	0,1097	0,0150	0,0359			
13	1,0009	0,8714	1,3793	0,5079	0,5071	0,9135	1,0042	0,1074	0,1074	0,0233	0,0117			
14	1,0013	0,8950	1,4013	0,5063	0,4999	0,8844	0,9604	0,0760	0,1074	0,0141	0,0325			
15	1,0011	0,8902	1,3919	0,5017	0,4999	0,8777	0,9892	0,1115	0,1074	0,0867	0,0124			
16	1,0013	0,9035	1,4016	0,4981	0,5088	0,9101	1,0376	0,1033	0,1108	0,0172	0,0361			
17	1,0014	0,8891	1,3988	0,5097	0,5088	0,8838	0,9957	0,1119	0,1108	0,0896	0,0126			
18	1,0018	0,8749	1,3728	0,4979	0,5088	0,8782	0,9878	0,1096	0,1117	0,0133	0,0361			
19	1,0008	0,8708	1,3730	0,5022	0,5052	0,8828	0,9821	0,0993	0,1117	0,0417	0,0130			
20	1,0009	0,8879	1,3961	0,5082	0,5052	0,9016	1,0257	0,1241	0,1117	0,0098	0,0371			

Anexo C. Resultados cáscara CCN-51.

NÚMERO MUESTRA		CÁSCARA CCN-51										PROMEDIO RESIDUO g		g CENIZA		g PROTEÍNA	
		FIBRA INSOLUBLE					FIBRA SOLUBLE										
		PAPEL SOLO g	PAPEL MUESTRA SECA g	RESIDUO g	PROMEDIO RESIDUO g	PAPEL SOLO g	PAPEL MUESTRA SECA g	RESIDUO g	PROMEDIO RESIDUO g	PAPEL MUESTRA SECA g	RESIDUO g						
1	1,0015	0,8103	1,3922	0,5819	0,5601	0,9095	1,0203	0,1074	0,1081	0,0216	0,0120						
2	1,0016	0,8845	1,4228	0,5383		0,8967	1,0054	0,1087		0,0187	0,0439						
3	1,0011	0,9192	1,4679	0,5487	0,55185	0,8777	0,9892	0,1115	0,1074	0,0258	0,0119						
4	1,0012	0,8905	1,4455	0,5550		0,9101	1,0376	0,1033		0,0170	0,0443						
5	1,0017	0,8586	1,4642	0,6056	0,5605	0,8829	0,9936	0,1107	0,1092	0,0286	0,0112						
6	1,0018	0,8676	1,383	0,5154		0,8937	1,0013	0,1076		0,0214	0,0440						
7	1,0005	0,8399	1,4117	0,5718	0,5422	0,8838	0,9957	0,1119	0,1108	0,0287	0,0131						
8	1,0004	0,8767	1,3892	0,5125		0,8782	0,9878	0,1096		0,0131	0,0404						
9	1,0009	0,8923	1,4027	0,5104	0,5481	0,8888	1,0032	0,1144	0,1095	0,0295	0,0118						
10	1,0008	0,8106	1,3964	0,5858		0,9030	1,0076	0,1046		0,0188	0,0427						
11	1,0014	0,8400	1,4150	0,5750	0,5472	0,8828	0,9821	0,0993	0,1117	0,0276	0,0098						
12	1,0015	0,8957	1,4151	0,5194		0,9016	1,0257	0,1241		0,0222	0,0441						
13	1,0012	0,8596	1,4088	0,5492	0,53215	0,9135	1,0142	0,1074	0,1197	0,0357	0,0135						
14	1,0011	0,9085	1,4236	0,5151		0,8844	1,0164	0,1320		0,0212	0,0406						
15	1,0003	0,8597	1,4332	0,5735	0,5518	0,9176	1,0279	0,1103	0,1145	0,0274	0,0143						
16	1,0004	0,8813	1,4114	0,5301		0,9142	1,0329	0,1187		0,0175	0,0443						
17	1,0014	0,8891	1,3988	0,5097	0,5288	0,9112	1,0216	0,1104	0,1180	0,0388	0,0126						
18	1,0018	0,8249	1,3728	0,5479		0,8914	1,0169	0,1255		0,0134	0,0404						
19	1,0008	0,8708	1,3730	0,5022	0,5402	0,9035	1,0275	0,1240	0,1165	0,0322	0,0114						
20	1,0009	0,8179	1,3961	0,5782		0,9139	1,0229	0,1090		0,0524	0,0476						

Anexo D. Resultados mucílago CCN-51.

		MUCÍLAGO CCN-51											
		FIBRA INSOLUBLE						FIBRA SOLUBLE					
NÚMERO MUESTRA	MUESTRA	PAPEL SOLO g	PAPEL MUESTRA SECA	RESIDUO	PROMEDIO RESIDUO	PAPEL SOLO	PAPEL MUESTRA SECA	RESIDUO	PROMEDIO RESIDUO	PAPEL SOLO	PAPEL MUESTRA SECA	RESIDUO	PROMEDIO RESIDUO
1	3,0008	1,3633	1,4356	0,0723	0,0847	1,0430	1,4589	0,4159	0,4113	1,0620	1,4686	0,4066	0,4113
2	3,0010	1,3832	1,4802	0,0970	0,0915	1,0314	1,4573	0,4259	0,4041	1,0671	1,4493	0,3822	0,4041
3	3,0009	1,3803	1,4606	0,0803	0,0906	1,0120	1,4385	0,4265	0,4183	1,0132	1,4233	0,4101	0,4183
4	3,0007	1,3797	1,4824	0,1027	0,0942	1,0016	1,4367	0,4351	0,4332	1,0089	1,4402	0,4313	0,4332
5	3,0008	1,3779	1,4954	0,1175	0,0884	1,0194	1,4392	0,4198	0,4224	1,0188	1,4438	0,4250	0,4224
6	3,0006	1,3856	1,4492	0,0636	0,0951	1,0193	1,4272	0,4079	0,4190	1,0197	1,4497	0,4300	0,4190
7	3,0004	1,3727	1,4526	0,0799									
8	3,0008	1,3612	1,4696	0,1084									
9	3,0002	1,3615	1,4716	0,1101									
10	3,0005	1,3716	1,4382	0,0666									
11	3,0006	1,3611	1,4366	0,0755									
12	3,0003	1,3651	1,4797	0,1146									

Anexo E. Resultados mucílago TSH-565.

		MUCÍLAGO TSH-565									
		FIBRA INSOLUBLE					FIBRA SOLUBLE				
NÚMERO MUESTRA	MUESTRA g	PAPEL SOLO g	PAPEL MUESTRA SECA g	RESIDUO g	PROMEDIO RESIDUO g	PAPEL SOLO g	PAPEL MUESTRA SECA g	RESIDUO g	PROMEDIO RESIDUO g	PAPEL SOLO g	PROMEDIO RESIDUO g
1	3,0017	1,2589	1,3302	0,0713	0,0885	1,1054	1,5103	0,4049	0,3974	0,0276	0,0333
2	3,0018	1,2453	1,3509	0,1056	0,0809	1,1104	1,4902	0,3798	0,3804	0,0020	0,0157
3	3,0014	1,2533	1,3346	0,0813	0,0826	1,1298	1,4896	0,3598	0,3992	0,0259	0,0336
4	3,0014	1,2644	1,3449	0,0805	0,0843	1,1173	1,5183	0,4010	0,3987	0,0051	0,0127
5	3,0015	1,2563	1,3291	0,0728	0,0813	1,1302	1,5189	0,3887	0,3993	0,0297	0,0334
6	3,0014	1,2452	1,3377	0,0925	0,0822	1,1105	1,5201	0,4096	0,3965	0,0070	0,0154
7	3,0016	1,2473	1,3231	0,0758	0,0813	1,1496	1,5957	0,4461	0,3993	0,0285	0,0344
8	3,0015	1,2563	1,3491	0,0928	0,0813	1,1772	1,5284	0,3512	0,3965	0,0036	0,0130
9	3,0017	1,2393	1,3317	0,0924	0,0813	1,1173	1,5189	0,4016	0,3993	0,0222	0,0331
10	3,0016	1,2462	1,3163	0,0701	0,0822	1,1203	1,5172	0,3969	0,3965	0,0087	0,0130
11	3,0014	1,2399	1,3431	0,1032	0,0822	1,1298	1,5473	0,4175	0,3965	0,0213	0,0335
12	3,0015	1,2562	1,3174	0,0612	0,0822	1,1373	1,5127	0,3754	0,3965	0,0030	0,0161