

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

Sede de Atenas

Ingeniería en Tecnología de Alimentos

VALORIZACIÓN DE LA CASCARILLA RESIDUAL DEL PROCESAMIENTO
AGROINDUSTRIAL DEL CACAO (*THEOBROMA CACAO L*) PARA SU
POTENCIAL APLICACIÓN EN INFUSIONES

Trabajo final de graduación para optar por el grado de
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

MARIAM DELGADO TREJOS

Atenas, Costa Rica

2023

DECLARACIÓN JURADA

Yo Mariam Delgado Trejos, portadora de la cédula de identidad número 1-1658-0582, estudiante de la Universidad Técnica Nacional (UTN) en la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos, conocedora de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el (la) Director (a) de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juro solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborado siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, así como con los derechos de autor.

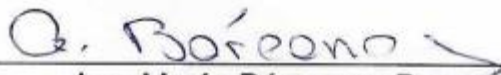
En fe de lo anterior, firmo en la ciudad de Atenas, a los 28 días del mes de julio del 2023.



Mariam Delgado Trejos
1-1658-0582

HOJA DE APROBACIÓN

Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Tecnología de Alimentos



Ana María Bárcenas Parra
Directora de Carrera



Angie Mariela Blanco González
Tutora del TFG



Wilfredo Flores del Valle
Lector Externo TFG



Fernando Gámez Rodríguez
Lector TFG

DEDICATORIA

Este trabajo final de gradación es el resultado de muchos años de esfuerzo y disciplina, de darme cuenta cuan capaz soy y de la gran profesional con el valor de la perseverancia en la que me he convertido, es por esto que el culminar este proyecto significa tanto para mí, porque lo inició una persona que temía sentirse perdida en el ámbito laboral y lo termina una mujer convencida de que ama lo que estudió, se lo dedico a esa Mariam que muchas veces puede estar confundida pero nunca deja de tener presente sus metas y lo feliz que la hace luchar por estas.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la vida, por darme unos padres que desde muy pequeña me inculcaron muy buenos valores y me dieron las herramientas que me convirtieron en una mujer independiente y con ansias de comerse el mundo. Gracias, porque sin sus esfuerzos esto no sería posible.

También agradezco a mis Titos pilares importantes en mi educación desde pequeña. A mi hermano, quien siempre con sus sabias palabras sabe cómo hacerme tranquilizar y darme valor para que persiga mis anhelos.

Sin duda soy muy afortunada de que formen parte de mi vida, les amo.

A los amigos y amigas que me deja esta etapa universitaria, siempre tendrán un lugar muy importante en mi corazón, gracias por tantos años juntos, siempre vivirán en mi memoria, les quiero.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN JURADA	ii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDOS	6
TABLA DE FIGURAS	9
TABLA DE TABLAS	10
RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Área de estudio	15
1.2 Delimitación del problema	15
1.3 Justificación.....	16
1.4 Antecedentes	18
1.5 Objetivos	21
1.5.1 Objetivo general.....	21
1.5.2 Objetivos específicos	21
II. MARCO TEÓRICO	22
2.1 Cacao.....	23
2.1.1 Origen.....	23
2.1.2 Taxonomía.....	23
2.1.3 Tipificación.....	24
2.1.4 Composición nutricional	25
2.1.5 Propiedades funcionales.....	26
2.1.6 Procesamiento.....	27
2.1.7 Producción y consumo.....	31
2.1.8 Subproductos del cacao	33
2.2 Valorización de residuos	34

2.2.1	Reducción de las pérdidas y desperdicios de alimentos	35
2.2.2	Aprovechamiento de residuos.....	36
2.2.3	Experiencias en la reducción de pérdidas y desperdicios de alimentos y el aprovechamiento de subproductos.....	38
III.	MARCO METODOLÓGICO.....	39
3.1	Enfoque y tipo de investigación	40
3.2	Sujetos y fuentes de información.....	41
3.3	Pregunta generadora	41
3.4	Variables.....	42
3.5	Población y muestra.....	46
3.6	Descripción de la metodología	47
3.6.1	Objetivo específico 1.....	47
3.6.2	Objetivo específico 2.....	61
3.7.1	Objetivo 3	68
3.7.2	Objetivo 4	72
3.8	Técnicas e instrumentos para recolección de información.....	74
3.9	Técnicas de análisis de la información	74
IV.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	76
4.1	Idoneidad del proceso de obtención de la materia prima.....	77
4.1.1	Análisis del procesamiento	77
4.1.2	Análisis microbiológicos y de toxinas	77
4.2	Caracterización de la cascarilla de cacao.....	80
4.3	Análisis de la aplicabilidad de la cascarilla de cacao en infusiones	82
4.3.1	Grupo focal preliminar.....	82
4.3.2	Análisis fisicoquímicos a prototipos.....	84
4.3.3	Análisis de contenido antioxidante.....	85
4.4	Validación de la aplicación	86
4.4.1	Encuesta a potenciales consumidores	87
4.4.2	Grupo focal final.....	90
4.4.3	Análisis de contenido antioxidante	92
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	93

5.1	Conclusiones.....	94
5.2	Recomendaciones.....	95
VI.	REFERENCIAS.....	97
VII.	APÉNDICES.....	106
7.1	Resultados de análisis proximales desarrollados a cascarilla de cacao, objetivo específico 2	107
7.2	Desarrollo de metodología “Determinación de proteína mediante método Kjeldahl, referencia AOAC 950.48”	109
7.3	Transcripción grupo focal final preliminar, objetivo específico 3	110
7.4	Cuestionario aplicado en panel sensorial.....	113
7.5	Resultados obtenidos en panel sensorial.....	114
7.6	Resultados de análisis proximales desarrollados a prototipos de infusiones, objetivo específico 3.....	115
7.7	Muestras de turbidez en los diferentes prototipos de infusiones.....	117
7.8	Resultados visuales del desarrollo de la metodología “Determinación de acidez titulable mediante método potenciométrico”	117
7.9	Resultados de encuesta, objetivo específico 4	119
7.10	Transcripción grupo focal 1 final, objetivo específico 4.....	122
7.11	Transcripción grupo focal 2 final, objetivo específico 4.....	123
VIII.	ANEXOS	125
8.1	Datos crudos reportados por laboratorio externo en análisis de Salmonella, Escherichia coli y aflatoxinas	126
8.2	Ejemplo proceso de determinación de presencia de colonias típicas Salmonella spp. en diferentes tipos de agares.....	126
8.3	Identificación bioquímica de Salmonella spp. mediante el método de inoculación TSI y LIA	128
8.4	Ejemplo de morfología colonial de Escherichia coli en petrifilm	129
8.5	Resultados de análisis proximales reportados por otros autores, objetivo específico 2.....	129
8.6	Resultados de análisis proximales reportados por otros autores, objetivo específico 3.....	130
8.7	Datos crudos reportados por laboratorio externo en análisis de concentración de equivalentes de trolox en el prototipo de infusión seleccionado.....	131

TABLA DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación taxonómica del cacao	24
Figura 2 Diagrama de flujo para el aprovechamiento de cacao	27
Figura 3 Diagrama de flujo para la obtención de chocolate	29
Figura 4 Identificación bioquímica de <i>Salmonella spp</i> en la muestra	52
Figura 5 Criterios por seguir para la identificación bioquímica de <i>Salmonella spp</i> en la muestra	53
Figura 6 Flujograma para la determinación de recuento <i>E. coli</i> en alimentos	55
Figura 7 Paso a paso para la determinación de aflatoxinas mediante el método ELISA de AgraQuant®	59
Figura 8 Resultados de encuesta, ¿cuál mezcla de infusión se le hace más interesante de probar?	88
Figura 9 Resultados encuesta, ¿probaría usted una infusión que dentro de sus ingredientes cuente con cascarilla de cacao, sabiendo que tiene función antioxidante?	89
Figura 10 Proceso de inicio de digestión en muestra de cascarilla de cacao	109
Figura 11 Resultado del proceso acabado de digestión en muestra de cascarilla de cacao	109
Figura 12 Destilador para proceso de determinación de proteína	110
Figura 13 Resultados de titulación con HCl para determinación de proteína	110
Figura 14 Turbidez de prototipos de infusiones a base de cascarilla de cacao	117
Figura 15 Diferencia visual de color en muestra sin titular y titulada para determinación de acidez	117
Figura 16 Repetición de muestra de prototipo de infusión cascarilla de cacao y canela titulada en análisis de acidez	118
Figura 17 Repetición de muestra de prototipo de infusión cascarilla de cacao y jengibre titulada en análisis de acidez	118
Figura 18 Repetición de muestra de prototipo de infusión cascarilla de cacao y hierba buena titulada en análisis de acidez	119
Figura 19 Resultados encuesta, ¿cuál es su sexo?	119
Figura 20 Resultados encuesta, ¿en qué rango de edad se encuentra usted?	120
Figura 21 Resultados encuesta, ¿ha consumido anteriormente infusiones?	120
Figura 22 Resultados encuesta, ¿con qué frecuencia consume usted infusiones?	121
Figura 23 Resultados encuesta, ¿cuáles son las tres características más importantes que usted toma en cuenta a la hora de adquirir infusiones?	121
Figura 24 Resultados encuesta, ¿qué opina usted sobre una infusión que dentro de sus ingredientes contiene cascarilla de cacao?	122

Figura 25 Tabla de resultados de análisis microbiológicos y de aflatoxinas reportados por laboratorio externo	126
Figura 26 Resultado de morfología colonial de <i>Salmonella spp.</i> en medio agar XLD	126
Figura 27 Resultado de morfología colonial de <i>Salmonella spp.</i> en medio agar Hecktoen	127
Figura 28 Resultado de morfología colonial de <i>Salmonella spp.</i> en medio agar cromogénico ASAP	127
Figura 29 Proceso de inoculación de <i>Salmonella spp</i> mediante el método de inoculación TSI y LIA	128
Figura 30 Ejemplos de resultados en reacciones de TSI, LIA y citrato en cepas de <i>Salmonella spp</i>	128
Figura 31 Morfología colonial de <i>E.coli</i> en petrifilm	129
Figura 32 Concentración de equivalentes de trolox en la muestra	131

TABLA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los granos de cacao	25
Tabla 2. Principales productores de cacao en grano (toneladas)	31
Tabla 3. Definición y operacionalización de variables	42
Tabla 4. Reactivos y materiales para la determinación de Salmonella mediante el método VIDAS - Easy SLM de la casa Biomerieux	54
Tabla 5. Reactivos y materiales para la determinación de E.coli mediante los métodos AOAC 991.14, AOAC 998.08, AOAC 986.33 y AOAC 989.10	57
Tabla 6. Características para el uso de uso ELISA con filtro 450nm	59
Tabla 7. Reactivos y materiales para la determinación de aflatoxinas mediante el método ELISA	60
Tabla 8. Reactivos y materiales para la determinación de humedad mediante método gravimétrico, referencia AOAC 925.19	62
Tabla 9. Reactivos y materiales para la determinación de grasa mediante método extracción de soxhlet, referencia AOAC 963.15	63
Tabla 10. Reactivos y materiales para la determinación de cenizas mediante método gravimétrico, referencia AOAC 923.03	64
Tabla 11. Reactivos y materiales para la determinación de proteína mediante el método kjeldahl, referencia AOAC 950.48	65
Tabla 12. Reactivos y materiales para la determinación de fibra cruda mediante la técnica de bolsa de filtro	67
Tabla 13. Reactivos y materiales para la determinación de grados brix mediante método refractométrico	70

Tabla 14. Reactivos y materiales para la determinación de pH mediante método potenciométrico, AOAC 918.12	70
Tabla 15. Reactivos y materiales para la determinación de acidez titulable mediante método potenciométrico	71
Tabla 16. Reactivos y materiales de la determinación de capacidad antioxidante mediante lector de microplacas	73
Tabla 17. Resultados de análisis microbiológicos a muestra compuesta de cascarilla de cacao	78
Tabla 18. Resultados de análisis toxicológicos a muestra compuesta de cascarilla de cacao	79
Tabla 19. Resultados de análisis proximal a la cascarilla de cacao	80
Tabla 20. Resultados de análisis proximales obtenidos por otros autores	82
Tabla 21. Resultados de preferencia según grupo focal preliminar	84
Tabla 22. Resultados de análisis proximales a prototipos de infusiones	84
Tabla 23. Resultados de panel sensorial a prototipos	86
Tabla 24. Resultados de la evaluación del foro 1 sobre la infusión de cascarilla de cacao y canela mediante grupo focal	91
Tabla 25. Resultados de la evaluación del foro 2 sobre la infusión de cascarilla de cacao y canela mediante grupo focal	91
Tabla 26. Resultados de análisis de humedad en muestra compuesta de cascarilla de cacao	107
Tabla 27. Resultados de análisis de cenizas en muestra compuesta de cascarilla de cacao	107
Tabla 28. Resultados de análisis de proteína en muestra compuesta de cascarilla de cacao	107
Tabla 29. Resultados de análisis de grasa en muestra compuesta de cascarilla de cacao	108
Tabla 30. Resultados de análisis de fibra cruda en muestra compuesta de cascarilla de cacao	108
Tabla 31. Preferencia de infusiones en grupo focal preliminar realizado a potenciales consumidores de infusiones	113
Tabla 32. Resultados de panel sensorial a prototipos de infusiones	114
Tabla 33. Resultados de análisis de pH en muestras de prototipos de infusiones	115
Tabla 34. Resultados de análisis de brix en muestras de prototipos de infusiones expresado en °brix	116
Tabla 35. Resultados de análisis de acidez titulable en muestras de prototipos de infusiones expresado en porcentaje de acidez	116
Tabla 36. Evaluación grupo focal 1 realizado a potenciales consumidores de infusiones en prototipo final	123

Tabla 37. Evaluación grupo focal 2 realizado a potenciales consumidores de infusiones en prototipo final	124
Tabla 38. Resultados de análisis proximales realizados a cascarilla de cacao por otros autores (g/100g)	129
Tabla 39. Resultados de análisis proximales realizados a cascarilla de cacao por otros autores (%)	130
Tabla 40. Resultados de análisis proximales reportados en infusiones a base de cascarilla de cacao por otros autores	130

RESUMEN

El presente trabajo de graduación aborda la problemática de la falta de aprovechamiento de los residuos de la agroindustria alimentaria para la obtención de subproductos alimenticios, a partir de lo cual se estudia el uso potencial de la cascarilla de cacao en infusiones.

Para ello, se evaluó la viabilidad técnica de este subproducto mediante análisis y ensayos experimentales; en ellos se verificaron aspectos a nivel microbiológico y de toxinas, se establecieron caracterizaciones nutricionales y se valoraron variables fisicoquímicas y funcionales. Asimismo, se realizaron algunos grupos focales, paneles sensoriales y encuestas para verificar potencial aceptación.

Una vez realizada la caracterización de la materia prima para validar su optimización para consumo humano, los resultados fueron alentadores, pues arrojaron un proceso idóneo y de bajo riesgo a nivel de inocuidad alimentaria: no se encontró presencia de microorganismos como *Escherichia coli* ni *Salmonella spp*, además de que se verificó la ausencia de aflatoxinas. Por su parte, en el estudio de composición nutricional de la materia prima, con el fin de conocer los aportes del producto, se encontró la presencia de diversos nutrientes como minerales y fibra.

Una vez claro el panorama, se desarrollaron prototipos de infusiones tomando como base la cascarilla de cacao. La matriz seleccionada fue la compuesta por el subproducto de cascarilla de cacao y canela, que se analizó con el fin de determinar la presencia de antioxidantes; los resultados obtenidos lo confirmaron con un total de $684 \pm 66 \mu\text{mol/L}$ en la muestra.

Finalmente, en las diversas metodologías aplicadas con potenciales consumidores de bebidas se determinó el agrado e interés del prototipo. Así, se advierte en esta investigación que la industria del cacao tiene en la cascarilla residual una alternativa enfocada al aprovechamiento de un subproducto que puede ser tomado en cuenta para futuras diversificaciones.

I. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria tiene un gran reto y es que, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO] (2019), la pérdida y el desperdicio de alimentos es una de las grandes problemáticas hoy en día. La sensibilidad demostrada por el consumidor actual ha generado un replanteamiento de los objetivos de desarrollo sostenible en diferentes países, lo cual ha permitido que se active el comercio a base de subproductos o residuos valorizables de alimentos.

Los residuos agroindustriales del cacao son utilizados en su mayoría como alimento animal, dado su alto porcentaje de fibra; sin embargo, se desaprovecha el valor funcional de estos subproductos para consumo humano. Por ende, han surgido varios proyectos que tienen como base aprovechar estos residuos en una cadena de valor como materias primas alimentarias, herbicidas o empaques.

De acuerdo con la evolución del mercado actual, se propone este proyecto, en el cual se contempla la valorización de un subproducto del cacao, específicamente la cascarilla, con el fin de analizar su potencial en una infusión a base de dicho residuo, dado a que el fruto cuenta con análisis que demuestran que posee grandes aportes a nivel nutricional. Este estudio caracteriza el perfil de la cascarilla de cacao y demuestra mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos las propiedades funcionales como valor agregado, para validar la mejor formulación para lanzar al mercado.

1.1 Área de estudio

El presente trabajo de investigación se inscribe en los estudios propios de la carrera de Ingeniería en Tecnología de los Alimentos, específicamente en las líneas de investigación de sostenibilidad, aporte nutricional, valorización de subproductos alimentarios, cacao e infusiones.

1.2 Delimitación del problema

La falta de valorización de subproductos representa una problemática para la industria alimentaria, y es que a nivel mundial alrededor de un tercio de los alimentos producidos se pierden o desperdician, esto debido a la falta de

conciencia ambiental generada por el desconocimiento de los daños colaterales que pueden desencadenar el desecho de alimentos. En Costa Rica, se generan más de 6,3 billones de toneladas de residuos orgánicos sólo en el sector económico primario, lo que evidencia el desafío que tiene la industria alimentaria para lograr una concientización a nivel colectivo, tomando en cuenta consumidores y productores, esto con el fin de mitigar el daño ambiental generado por décadas.

Años atrás, la población mundial no era consciente del deterioro que se generaba a nivel ambiental, económico y social por el desaprovechamiento de algunos subproductos alimentarios, situación que motiva este proyecto para analizar las propiedades funcionales de la cascarilla de cacao, las cuales han estado en estudio a lo largo de los años y no han sido valoradas por los productores a pesar de sus cualidades a nivel nutricional. Este subproducto es desaprovechado por la mayoría de los productores y no se contempla para consumo humano situación que deja abiertas las posibilidades para que fabricantes del sector hagan de esta actividad parte de una economía circular la cual aproveche toda la biomasa que contiene propiedades y en la cual Costa Rica ocupa una posición con mucho potencial, concientizando de esta forma al sector del surgimiento de una nueva línea en el mercado con un enfoque ambiental evitando así la contaminación de agua, aire y suelos que generan los residuos orgánicos, empero en este estudio se busca determinar ¿cuál es el potencial tecnológico que tiene para su uso en infusiones?

1.3 Justificación

El aprovechamiento óptimo de residuos agroindustriales se ha convertido en una estrategia ambiental, económica y socialmente adecuada al pertenecer a uno de los grupos con mayor cantidad de desechos generados. Una de las fuentes más utilizadas son las frutas, ya que su uso puede partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, debido a que no son de utilidad para el proceso que los generó, pero sí se pueden aprovechar o transformar para obtener otro producto.

En los últimos años, las preferencias de los consumidores han variado, por lo que el cuidado de su salud ha pasado a un primer plano, con lo cual ha surgido en la industria alimentaria una tendencia enfocada en los alimentos funcionales, es decir, se busca agregar propiedades extras a las que ya trae el alimento por sí mismo. Esta es una oportunidad para crear alternativas viables que logren colocar los subproductos que presentan características óptimas para su aprovechamiento en otra cadena de producción.

A raíz de la problemática expuesta con respecto al manejo de los subproductos en la industria alimentaria, se propuso en esta investigación desarrollar una estrategia para la valorización del residuo cascarilla de cacao como materia prima, mediante su aplicación en infusiones, dado a que esta es una línea en la cual sus potenciales consumidores suelen ser conocidos por buscar alimentos que beneficien su salud. De esta manera, se ideó agregar valor al proceso productivo del cacao esperando obtener una formulación que ofrezca al consumidor un producto con propiedades funcionales y sabor agradable que pueda incluir en su dieta y a la industria una nueva línea de producción de un producto que actualmente se desecha y causa daños irreversibles en el ecosistema. Por lo tanto, se analizaron diversas matrices, es decir, la cascarilla de cacao y otros ingredientes que aportan las características deseadas, buscando de esta manera potenciar el aprovechamiento de subproductos que aporten propiedades funcionales tales como son los antioxidantes, fortaleciendo así la agroindustria costarricense.

En conclusión, este proyecto tuvo como objetivo evaluar las condiciones preliminares de proceso mediante diversos análisis para determinar el potencial de la cascarilla de cacao, producido en Puriscal, en infusiones, obteniendo caracterizaciones a nivel proximal, fisicoquímico, microbiológico y de micotoxinas futuras bases para investigaciones y logrando fortalecer el sector agroindustrial costarricense con una propuesta de reactivación del cultivo de cacao mediante la recomendación de la mejor alternativa para incursionar en el mercado de bebidas bajo un enfoque de aprovechamiento de tendencias.

1.4 Antecedentes

Según el informe de la FAO (2019), la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos puede abordarse desde una estrategia que busque disminuir los costos de producción, mejorar la seguridad alimentaria y la nutrición, además de contribuir a la sostenibilidad del medio ambiente. De esta manera, se alivia la presión sobre los recursos naturales y se reducen las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), siendo esta la base de la iniciativa tomada por la industria enfocada en nuevos desarrollos de valorización y aprovechamiento de recursos, al respecto, Polenta (2016) expresa que existe gran cantidad de descartes en los cuales están presentes compuestos altamente valorados por los consumidores actuales, convirtiéndose en una propuesta interesante gracias a su valor agregado que impulsa la competitividad de toda la cadena.

De acuerdo con FAO (2019), América Latina y el Caribe representan solo el 9% de la población mundial, no obstante, son los responsables del 20% de la cantidad global de alimentos que se pierden desde la post cosecha hasta la etapa minorista. Asimismo, se evidencia que en estas zonas la pérdida de productos por grupos de alimentos como las frutas y hortalizas representaron el segundo lugar.

La valorización de los residuos orgánicos ha incrementado su popularidad, ya que varias industrias se han dado a la tarea de dar utilidad a sus subproductos o residuos; según Conesa (2019) esto ocurre gracias a que contienen numerosos compuestos de alto valor añadido. En el país, mediante la Ley para la Gestión Integral de Residuos N.º 8839, se busca fomentar el desarrollo de mercados de subproductos, materiales valorizables y productos reciclados, reciclables y biodegradables, entre otros. De manera que se generen nuevas fuentes de empleo y emprendimientos, se aumente la competitividad y se aprovechen los recursos para incrementar el valor agregado a la producción nacional.

Además, se ha formulado el programa Aprovechamiento de Productos y Residuos Agroalimentarios (APRA) guiado por la carrera Ingeniería en Tecnología de Alimentos de la Universidad Técnica Nacional, el cual tiene como objetivo llevar a cabo investigaciones bajo el enfoque de valorización de biomasa residual

agroalimentaria, buscando una mejora en la sostenibilidad, menor impacto ambiental y la disminución de pérdidas y desperdicio de alimentos. Como resultado a la implementación se han desarrollado protocolos para el aprovechamiento eficiente de la biomasa residual de alimentos tales como plátano verde (*Musa AAB*), aguacate Hass (*Persea americana*) y café, constituyendo de esta manera un marco de referencia útil a nivel nacional para el impulso de la generación de subproductos con alto valor nutricional y tecnológico (Blanco-González, 2021).

El desarrollo a nivel de investigación de los aportes nutricionales en los subproductos del cacao es un eje que emergente, autores como John *et al.* (2019) han caracterizado nutricionalmente algunos de los subproductos del cacao, dentro de ellos la cascarilla, residuo tratado en este trabajo final de graduación, y además mencionan algunas formas de mejorar el valor nutritivo de los mismos. Así mismo, Rodríguez López y Vargas Barrantes (2022) aseguran en su investigación enfocada a la viabilidad técnica para el aprovechamiento de la cascarilla que esta es fuente de fibra alimentaria y proteína de acuerdo con lo establecido por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10.

Con este residuo como tema de estudio se han generado diversas investigaciones, incluso con participación de empresas dedicadas a la industria; por ejemplo, Guanga (2018) buscó estudiar la opción más viable para aprovechar los residuos del cacao y así crear una estrategia comercial que se convierta en una fuente de ingresos alternativa para la compañía Nestlé. En dicha tesis se concluye que la gran cantidad de desperdicio generado puede ser utilizado para crear subproductos, lo cual es una ventaja competitiva para la empresa, contribuye con el medio ambiente y diversifica su oferta de productos; finalmente, propone elaborar un alimento para animales de granja y evidencia que es un mercado prometedor para incursionar.

En la Jornada de Investigación Encuentro Académico Industrial (2018), llevada a cabo por la Universidad Central de Caracas, se llevó a cabo una búsqueda de información enfocada en el área de cacao y una valorización de subproductos del proceso de postcosecha; los resultados indican que los principales usos del

subproducto cascarilla de cacao se enfocan en el desarrollo de bebidas y harinas (Norbis, Henríquez y Villanueva, 2018). Por otro lado, Tapia (2015) ofrece un ejemplo más claro cuando señala que se da un aprovechamiento de residuos agroindustriales de cacao, específicamente la cascarilla, elaborando una infusión. Es importante destacar que esta investigación demostró que se puede obtener una infusión con excelentes características beneficiosas para el consumidor. Este estudio experimental comparativo muestra similitud con respecto a esta investigación, con la diferencia de que en el presente estudio se busca analizar este subproducto con diferentes matrices que también aporten beneficios y se mejore la formulación para la infusión propuesta.

El evaluar la intención de consumo de un producto siempre generará un panorama más claro de la situación, justo esto fue lo que desarrollaron Teneda, Guamán y Oyaque (2019) en su investigación, la cual muestra resultados como disposición a comprar el té de cascarilla de cacao y tipos de preferencias en infusiones. Además, concluyen que los beneficiarios de un té hecho de la cascarilla de cacao son personas preocupadas por su salud, que buscan vitaminas y compuestos que la mejoran de forma natural.

Las propiedades funcionales forman parte de las características nutricionales más buscadas por los consumidores, razón por la cual se han analizado variables como el poder antioxidante. Al respecto, Rangel (2018) se basa en el desarrollo de un proceso a partir de un subproducto de guayaba mediante análisis de laboratorio donde buscó obtener un extracto líquido de polifenoles y carotenoides para optimizar este proceso. En el artículo de Negaresh y Marín (2013) se confirmó que no hay correspondencia lineal entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante en el fruto del cacao, es decir, que no siempre a mayor contenido de polifenoles exista una mayor actividad antioxidante, y es que según lo explica esta investigación las moléculas presentes en los polifenoles pueden ser muy variadas y son las encargadas de expresar la respuesta antioxidante.

El proyecto desarrollado aborda temas de interés investigados por otros autores, los cuales demuestran su pertinencia por la necesidad de un cambio global en

temas ambientales y alternativas de productos con un valor agregado, los cuales en su proceso contemplen la obtención de alimentos con un mejor aprovechamiento nutricional. Además, de estudiar la aplicabilidad del subproducto de la cascarilla en la industria con el fin de poder ofrecer en un futuro una diversificación en la producción de cacao.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad técnica del uso de cascarilla de cacao residual mediante análisis y ensayos experimentales para la estimación de su potencial aplicación en infusiones.

1.5.2 Objetivos específicos

- Verificar la idoneidad del proceso de obtención de la cascarilla de cacao para su uso como materia prima en la elaboración de infusiones mediante análisis de laboratorio microbiológicos y de toxinas.
- Caracterizar la cascarilla de cacao por medio de análisis fisicoquímicos y sistematización de información de estudios previos para el ajuste de la aplicación.
- Analizar la aplicabilidad de la cascarilla de cacao en diferentes mezclas herbales mediante ensayos experimentales para la formulación de prototipos de infusiones.
- Validar la aplicación de la matriz seleccionada del subproducto de cacao mediante análisis sensoriales, de antioxidantes y encuesta a potenciales consumidores para su evaluación como alternativa de valor agregado y comercialización.

II. MARCO TEÓRICO

Este capítulo tiene como base el profundizar en información teórica general acerca del fruto del cacao y de sus subproductos, además de exponer temas relacionados a la valorización de residuos mediante su aprovechamiento y reducción de las pérdidas y desperdicios de alimentos.

2.1 Cacao

Su nombre científico es *Theobroma cacao* L, conocido comúnmente como cacao. Este es un alimento destinado usualmente a la producción de chocolate, manteca de cacao, licor de cacao o cacao en polvo. Sus granos son las semillas crudas y sus árboles suelen dar entre 20-50 frutos maduros, estos presentan forma de baya y miden entre 2-3 cm de largo, 1-1,5 cm de ancho y 1 cm de grosor (Gómez Pastor, 2020).

2.1.1 Origen

El cacao es una planta nativa de Sudamérica y domesticada en Mesoamérica (IICA *et al.*, 2017), y fueron los mayas quienes precisamente iniciaron su cultivo (CATIE, 2021). Sin embargo, hoy en día este producto suele cosecharse por toda la franja tropical del planeta en árboles que pueden llegar a medir hasta 15 metros de altura (Siedentopp Ahnatalstraße, 2009). Este fruto tiene como preferencia las regiones cálidas y húmedas, por lo que más de 50 países ubicados en cuatro de los continentes lo producen con fines comerciales (IICA *et al.*, 2017).

2.1.2 Taxonomía

El cacao fue clasificado botánicamente por Carlos Linneo, quien indicó que este es un árbol de aproximadamente 4-8 m de alto perteneciente a la familia Esterculiácea (Vera Chang *et al.*, 2014). En la figura 1 se detalla la clasificación taxonómica del cacao:

Figura 1

Clasificación taxonómica del cacao



Fuente: IICA *et al.* (2017).

2.1.3 Tipificación

Existen tres tipologías de cultivares de cacao, estas se ramifican en variedades, híbridos y clones (IICA *et al.*, 2017). La principal es la variedad Forastero, la cual se localiza mayormente en África del oeste y Brasil. La siguiente variedad es el Criollo, reconocido por ser un cacao fino y de aroma cultivado en el Caribe, Venezuela, Papúa Nueva Guinea, las Antillas, Sri Lanka, Timor Oriental y Java. La variedad Trinitario es una mezcla de ambos (CATIE, 2021).

Las variedades pueden diferenciarse, según Siedentopp Ahnatalstraße (2009), por su aspecto, forma del fruto, color y aroma de los granos. El Criollo tiene granos muy aromáticos, son menos ácidos y poco amargos, el tipo Forastero suele ser de árboles robustos, resistentes y con un alto rendimiento, los granos de esta variedad tienen un sabor intenso, pocos aromas secundarios y son amargos o ácidos. El híbrido Trinitario es descrito por IICA *et al.* (2017) como un fruto muy heterogéneo genética y morfológicamente, sus plantas comúnmente son robustas, con frutos verdes o pigmentados y con semillas que van del violeta al rosa pálido.

2.1.4 Composición nutricional

El fruto del cacao aporta nutricionalmente gran cantidad de beneficios al ser humano. Las semillas de este alimento contienen altos niveles de grasas y polifenoles, los cuales representan aproximadamente un 10 % del peso del grano seco (Vera Chang *et al.*, 2014), además de que contienen una serie de macronutrientes, minerales y estimulantes que lo convierten en un alimento con gran aporte de energía (García, 2020). En la tabla 1 se detalla su composición.

Tabla 1

Composición de los granos de cacao

Compuesto	Características nutricionales
Proteínas y aminoácidos	Conforman el 60 % del nitrógeno total del fruto; en los granos sin procesamiento se encuentran mayormente: α -amilasa, β -fructosidasa y β -glucosidasa, estas son inactivadas la mayor parte en el tratamiento de cacao.
Teobromina y cafeína	La teobromina se halla aproximadamente en un 1.2 % y es la causante de la acción estimulante. La cafeína en el cacao es bastante baja, casi en una proporción diez veces menor a la teobromina.
Lípidos	La grasa representa un 97-99 % de triglicéridos, un 0.5-2 % de ácidos grasos libres (esteárico, palmítico principalmente), sustancias insaponificables (estearinas) y purinas.
Carbohidratos	Compuestos en su mayoría por almidones, también contienen pentosanos, galactanos, mucílagos y celulosa. Entre los carbohidratos solubles se encuentran: estaquiosa, rabinosa y sacarosa. El aroma en el tostado ocurre debido a que en la etapa de fermentación se produce la hidrólisis de la sacarosa responsable de formar los azúcares reductores.

Compuestos fenólicos	Estos están formados por cotiledones, los cuales son células parenquimatosas muy pequeñas que a la hora de mezclarse forman células mayores que almacenan polifenoles.
Ácidos orgánicos	Se encuentra conformado por ácido acético unido al ácido cítrico, succínico y málico. Se forman en la etapa de fermentación y dan el sabor característico al cacao.
Compuestos volátiles	Responsables del aroma característico del cacao, además, dan un sabor amargo astringente que tienen los granos de cacao producto de la fermentación.
Compuestos aromáticos	Los que se encuentran en mayor cantidad son el ácido acético, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal.

Fuente: Gómez Pastor (2020).

2.1.5 Propiedades funcionales

El cacao además de ser reconocido por los diversos productos con buen sabor que se pueden obtener de él, es buscado por el consumidor gracias a sus propiedades funcionales, las cuales se asocian a beneficios para la salud.

Dentro de los componentes que brindan un valor agregado a este fruto se encuentran sustancias como los antioxidantes, principalmente los compuestos fenólicos, los cuales son el grupo más amplio de sustancias no energéticas presentes en alimentos de origen vegetal (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012). Los polifenoles que destacan dentro de la composición del cacao son los flavonoides, especialmente catequinas, antocianinas y proacianidinas (Negaresh y Marín, 2013).

Los fenoles están compuestos por un anillo aromático, un anillo benceno y uno o más grupos hidróxidos, pero su naturaleza puede variar y ser desde muy sencilla hasta altamente polimerizados. En el caso de la estructura polifenólica de los flavonoides estos resultan ser ideales para la actividad secuestrante de radicales libres; además, se ha demostrado tener un mayor poder antioxidante que las vitaminas E y C, conocidas por ser los mejores antioxidantes naturales (Vázquez

Ovando, Ovando Medina, Adriano Anaya, Betancur Ancona y Salvador Figueroa, 2016).

Dentro de las propiedades de los polifenoles se encuentra su capacidad de controlar la actividad de diversas enzimas, lo que interfiere en mecanismos de señalización y en diferentes procesos celulares, debido a que sus características fisicoquímicas le permiten ser parte de diversas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012). Asimismo, estos están relacionados a la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, ya que aportan la pigmentación (Vázquez Ovando, Ovando Medina, Adriano Anaya, Betancur Ancona y Salvador Figueroa, 2016).

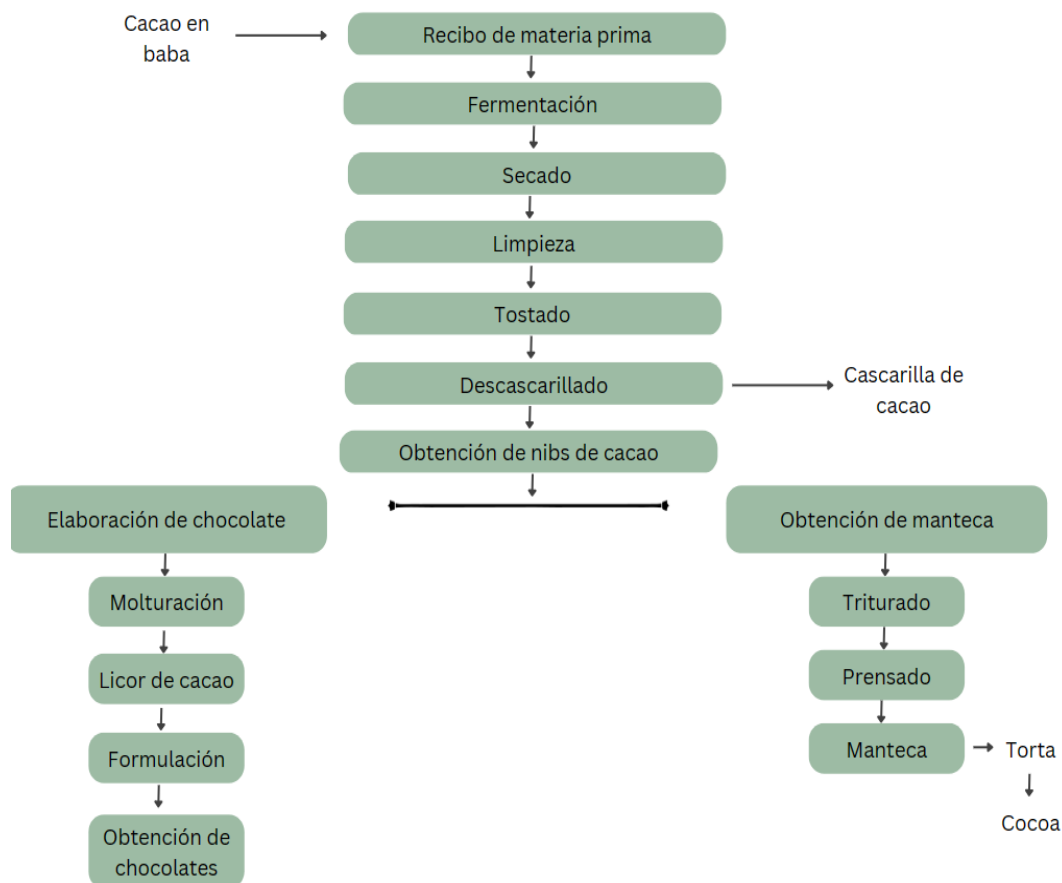
Los alcaloides, en este caso teobromina, cafeína y teofilina, forman parte de las moléculas alcaloides denominadas como metil-xantinas, las cuales están presentes en el fruto de cacao en diferentes porcentajes, donde la teobromina es la principal. Dentro de las principales características que aportan estas sustancias se encuentran el buen papel como estimulantes del sistema nervioso (Vázquez Ovando, Ovando Medina, Adriano Anaya, Betancur Ancona y Salvador Figueroa, 2016).

2.1.6 Procesamiento

El cacao es procesado para la producción de diversas materias primas que forman parte de las alternativas actuales de productos para consumo humano. A continuación, se detalla el proceso básico sin fases industrializadas de por medio.

Figura 2

Diagrama de flujo para el aprovechamiento de cacao



Fuente: Flores del Valle (2019).

En el diagrama de flujo anterior se detallan las fases para la obtención de manteca de cacao y chocolate. El proceso inicia una vez se encuentre cosechado el fruto; de este se obtiene el cacao en baba, el cual es recepcionado para iniciar el proceso de fermentación. En esta etapa los microorganismos involucrados como levaduras, bacterias ácido-lácticas y ácido acéticas se encargan de consumir los compuestos en la pulpa con el fin de desarrollar precursores de sabor dentro del grano de cacao. Tal y como señalan Rojas-Rojas *et al.* (2021), este proceso puede variar según el método implementado y el tipo de cultivo.

Así, una vez culminado este proceso se continúa con la etapa de secado, fase que también puede realizarse de diversas maneras, ya sea en túneles de secado al sol, en caso de ser un proceso artesanal, o bien mediante maquinaria industrializada en grandes fábricas; por tanto, el tiempo de duración dependerá de

dicha variable. Cuando el grano alcanza el porcentaje de humedad adecuado, se procede a la etapa de limpieza cuyo propósito es eliminar cualquier residuo orgánico no deseado. En la siguiente etapa tiene lugar el tostado, la cual variará en temperatura y duración según el método, ya sea a una gran escala mediante hornos o de manera artesanal mediante sartén eléctrico. A continuación, se desarrolla la fase de descascarillado, en la que se elimina la cascarilla para la obtención del nib de cacao, que luego permite obtener chocolate y manteca.

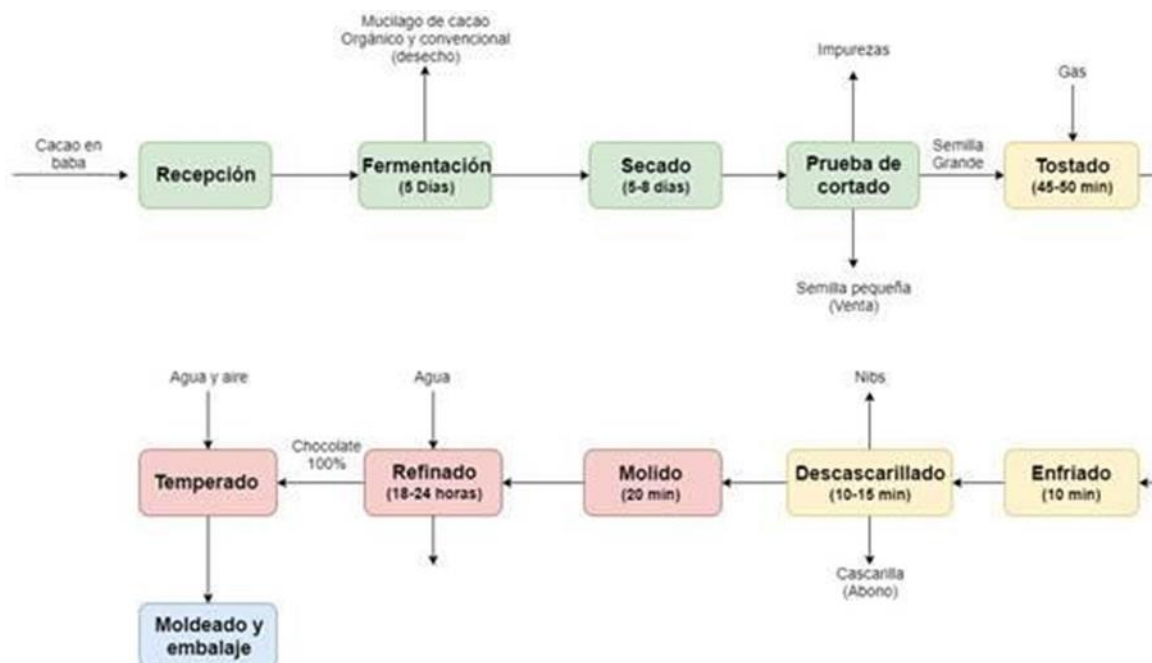
Para obtener manteca de cacao se inicia con la fase de triturado, donde se busca reducir el tamaño de los nibs hasta que se obtenga una pasta que es prensada con el fin de obtener la concentración del fluido. De esta manera se obtiene la manteca y una torta residual que se puede aprovechar para producir cocoa.

En el procesamiento de chocolates la primera etapa consta de una molturación. Con ella se busca refinar las partículas mediante fricción con temperatura (los tiempos pueden variar según las máquinas que se utilicen en el proceso), para obtener el licor de cacao, el cual es moldeado según la formulación correspondiente para la obtención del chocolate deseado. Flores del Valle (2019).

A continuación, en la Figura 3, se muestra el diagrama de flujo a nivel general; sin embargo, el proceso puede tener variables según el método. Por ejemplo, en el caso de un procesamiento a escala industrial los tiempos y temperaturas se encuentran previamente establecidos al ser un producto altamente estandarizado. Precisamente, en la Figura 3 se detalla el diagrama de flujo utilizado por una compañía para la obtención de chocolate.

Figura 3

Diagrama de flujo para la obtención de chocolate



Fuente: Pillco Herrera *et al.* (2020).

El proceso inicia con la recepción del fruto del cacao limpio y sin su cáscara (granos con mucílago); seguidamente se da la operación de fermentación, la cual tarda alrededor de cinco días y se realiza en cajas de madera, en esta se retira el mucílago. Al pasar el tiempo determinado, se inicia la etapa del secado, que consta de cinco a ocho días, hasta que el grano se seque. Posteriormente, se realiza la prueba de corte, fase que es opcional, con el fin de saber si la fermentación fue exitosa, deben tener entre un 75-80 % de fermentación. A continuación, con los granos seleccionados se tuesta y se deja enfriar; una vez llevadas a cabo estas operaciones, se realiza el descascarillado, donde se obtienen dos subproductos: la cascarilla del cacao y los nibs. Estos últimos continúan el proceso y son molidos y luego refinados, obteniendo a partir de ese momento el licor de cacao. Después de este punto, se pueden realizar diferentes procesos, ya que esta es la base para el desarrollo de productos como manteca de cacao o torta de cacao, las cuales incluyen las operaciones de temperado y moldeado (Pillco Herrera *et al.*, 2020).

2.1.7 Producción y consumo

Según la Organización Mundial del Cacao (ICCO), para el 2021 se estimó una producción récord mundial de 5024 toneladas (Tm), lo que significa un aumento del 6.3 % con respecto al año anterior. Esta producción total se divide entre diversas regiones productoras, la principal es África con un 77 %, le sigue América con un 17 % y Asia y Oceanía con un 6 % (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riesgo de Perú, 2021).

Tabla 2

Principales productores de cacao en grano (toneladas)

Años	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	2019/2020*	2020/2021**
Nivel mundial	4252	3994	4768	4648	4697	4728	5024
1 Costa de Marfil	1796	1581	2020	1964	2154	2105	2225
2 Ghana	740	778	970	905	812	800	950
3 Ecuador	261	232	290	287	322	328	340
4 Camerún	232	211	246	250	270	250	270
5 Nigeria	195	200	245	250	270	250	270
6 Indonesia	325	320	270	240	220	200	200
7 Brasil	230	141	174	204	176	201	180
8 Perú	92	105	115	134	136	151	150
9 República Dominicana	82	80	57	85	75	75	75
10 Colombia	51	53	55	55	59	64	65
Subtotal	4004	3700	4441	4373	4504	4454	4735
Otros	248	294	327	275	193	274	289

Fuente: (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riesgo de Perú, 2021).

*Estimado mayo 2021

** Previsiones mayo 2021

En la tabla anterior se muestran los países con mayor producción de cacao en la actualidad, algunos prevén aumentos interanuales como es el caso de Ghana,

dado al desarrollo de este país en iniciativas que fomentan la producción a nivel nacional, también Nigeria, debido al aumento de lluvias que parecen haber favorecido la próxima cosecha. A pesar de que se pronostica una disminución para América de forma general, Ecuador espera aumentar su producción; sin embargo, esto depende de varios factores tales como el comportamiento del clima, la presencia de plagas, etc. En el caso de Asia y Oceanía, se espera que países como Indonesia, Papúa Nueva Guinea y Malasia aumenten la cantidad de toneladas producidas (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riesgo de Perú, 2021).

Tanto en la importación como en la exportación a nivel mundial, el cacao es el principal insumo. Según la Promotora de Comercio en Costa Rica (PROCOMER), el 44 % de las exportaciones son de África y el 32 % de la Unión Europea, en el caso de las importaciones el 57 % provienen de la Unión Europea y el 15 % de Asia (Leitón, 2019). Las importaciones de cacao y sus derivados para el año 2021 registraron un aumento del 17.5 % en relación con el mismo periodo del año anterior, teniendo como valor US\$ 18.4 millones (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riesgo de Perú, 2021).

En Costa Rica, hasta 1979, el cacao fue una actividad de gran importancia para el sector agropecuario; empero, tuvo una reducción en su producción debido a la afectación por la enfermedad conocida como moniliasis (Chacón Lizano, 2019). En los últimos años el cultivo de este fruto se ha reactivado gracias a planes realizados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en las regiones Brunca, Norte y Huetar Atlántica, según O'Neal Coto (2019) periodista de la oficina de Divulgación e Información de la Universidad de Costa Rica.

El país ha mantenido su producción en toneladas con muy pocas variaciones por lo últimos 10 años, esto es alrededor de 700Tm por año, lo cual lo coloca en la posición 41 en el mundo, 17 en América y quinto país productor en Centroamérica. El cacao costarricense tiene las puertas abiertas para grandes oportunidades en el mercado internacional gracias a sus principales características de ser 100 % fino y de aroma (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018). Sin embargo, su rendimiento promedio es de 275 kg/ha/año y el 79 % de las fincas son de menos de 2 ha (Chacón Lizano, 2019).

Costa Rica, al igual que toda la región de América, se encuentra con una clara ventaja sobre los productores de cacao ordinario (África occidental principalmente), debido a que produce el fruto del cacao fino o de aroma. Este tipo representa aproximadamente el 10 % de la producción mundial, pero tiene un mayor valor en el mercado (Fountain y Huetz Adams, 2020). El cacao en América además posee un consumo propio muy significativo, incluso países como Brasil importan granos para satisfacer su consumo local (Fountain y Huetz Adams, 2020). Este panorama más los aumentos de consumo en el continente asiático permiten prever que se dará una mayor demanda de este fruto durante los próximos años en nuestro continente, según el Banco de Desarrollo para América Latina (2020).

2.1.8 Subproductos del cacao

La cáscara, la cascarilla y el mucílago son los subproductos que se obtienen del procesamiento agroindustrial del cacao, estos representan el 70 % de la fruta madura y varían según la demanda del cacao. El subproducto que más se genera es la cáscara, puesto que constituye el 70 % de los desechos totales y se estima una cantidad de 10 500 toneladas métricas por año de este subproducto (Makinde *et al.*, 2019).

De acuerdo con Norbis, Henríquez y Villanueva (2018), se obtuvieron algunos resultados sobre los principales estudios innovadores en la valorización de los subproductos del cacao. De estos proyectos los que se encuentran enfocados en la industria alimentaria abordan enfoques tales como el estudio de la adsorción de materiales orgánicos para la remoción de aceites y combustible presentes en aguas, la implementación de un método de extracción de pectina obtenida de los subproductos agroindustriales cascarilla y mucílago de cacao, el uso de la cascarilla de cacao venezolano como materia prima en infusiones y la obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarilla de las semillas tostadas del cacao. Esto evidencia que en las empresas surge la idea de hacia dónde dirigir el mercado y cómo aprovechar los residuos, así de buscar la manera de ayudar al medio ambiente.

2.1.8.1 Cascarilla de cacao

Como resultado del procesamiento agroindustrial del cacao, específicamente después de la operación de descascarillado, se obtiene como parte de los subproductos de este fruto la cascarilla (Teneda Llerena, Guamán Guevara y Oayque Mora, 2019). Esta representa aproximadamente el 12 % del peso de la semilla total, y se caracteriza por ser seca, crujiente y de color marrón (Sangronis, Soto, Valero y Buscema, 2014).

Diversos análisis sobre las cáscaras de frutas y vegetales indican que estas son fuente importante de nutrientes. Incluso, según Castillo, Álvarez y Contreras (2018), son fuentes principales de antioxidantes naturales y aportan pectinas, fibras, etc.

2.2 Valorización de residuos

Según el artículo 6 de la ley para la Gestión Integral de Residuos de la República de Costa Rica, se define un residuo como “material sólido, semisólido, líquido o gas cuyo generador o poseedor debe o requiere deshacerse de él, y que puede o debe ser valorizado o tratado responsablemente o, en su defecto, ser manejado por sistemas de disposición final adecuados” (Asamblea Legislativa, 2010). Los residuos se clasifican según su origen: urbanos, comerciales, industriales, agrícolas, ganaderos, forestales, de construcción y demolición, sanitarios, mineros y radioactivos (Pon, 2019).

La gestión de los residuos se ha convertido en un reto mundial, como lo ha expuesto la United Nations Environment Programme Finance (UNEP) en su informe: Perspectiva Mundial de la Gestión de Residuos. El nivel de residuos per cápita aumenta conforme crecen los ingresos de la región, factores tales como el aumento constante de la población y la migración de zonas rurales a urbanas han sido clave para que esto suceda (Wilson *et al.*, 2016). Alrededor de 10 mil millones de toneladas de residuos urbanos son generadas anualmente y siguen en aumento, la principal problemática recae en que la mayoría de los países en desarrollo carecen de la infraestructura legal y de gestión (Pon, 2019).

El impacto generado por los residuos repercute, según Pon (2019), en varias magnitudes, a nivel global en el agotamiento de recursos debido a la sobre

producción de una gran cantidad de materiales, también se encuentra ligado a la problemática del cambio climático, ya que muchos desechos no tienen un adecuado procesamiento. A estas problemáticas se suma la basura marina, que afecta costas y el hábitat acuático de diversas especies. Localmente se ve afectada la salud, dado que la disposición de los residuos es un tema de salud pública, y velar por la correcta disposición no siempre es posible. Otra problemática que envuelve esta situación es la ambiental, ya que la cantidad de residuos generados son excesivos en todas las industrias, se acumulan de forma desmesurada, lo cual dificulta que sean reincorporados al ciclo de descomposición. Por último, otro de los puntos de impacto a nivel local es la economía, dado a que la generación de residuos “pone en aprietos” a muchas compañías que están acostumbradas a producir sin un plan de gestión de residuos, lo cual les deja pérdidas importantes. Las diversas problemáticas expuestas anteriormente pueden llegar a manejarse mediante la generación de un modelo de economía circular cuyo objetivo sea la maximización de la recirculación de productos y materiales.

Tomando lo anterior como base es que Wilson, *et al.* (2016) exponen como es indispensable mejorar la financiación destinada a instalaciones que lleven a cabo estos procesos, con el fin de avanzar en la gestión de residuos, sin dejar de lado que deberían reducir los residuos en su punto de origen mediante la fomentación de la participación integral entre las partes interesadas.

2.2.1 Reducción de las pérdidas y desperdicios de alimentos

La pérdida de alimentos representa a los productos destinados al consumo humano que por factores generados por un mal procesamiento disminuye su calidad o cantidad, la mayoría de los casos son producidos por deficiencias en las cadenas de valor. Por otro lado, se definen desperdicios de alimentos a los alimentos para consumo humano que se desechan de forma intencional, esta incluye solo productos descartados por parte de los consumidores finales (CCA, 2017).

Según un estudio llevado a cabo por la FAO, un tercio de las partes comestibles de los alimentos producidos se pierde o desperdicia, generando alrededor de 1300 millones de toneladas por año (FAO, 2012). Para lograr la disminución de estos

indicadores, en El estado mundial de la agricultura y la alimentación (2019) se propone abordar la problemática como una forma de lograr otros objetivos, algunos de estos están relacionados con mejoras en la eficiencia del sistema alimentario, seguridad alimentaria y nutrición, además de avanzar en temas de desarrollo sostenible (FAO, 2019).

Debido al aumento constante de la población mundial, la Organización de Naciones Unidas (ONU) recomienda dar la importancia que amerita esta situación, por lo que dentro de sus objetivos de desarrollo sostenibles propuestos para el 2030 se encuentra contemplado en el objetivo 12: producción y consumo responsables. La meta es reducir a la mitad los índices de desperdicio de alimentos per cápita a nivel mundial en la venta minorista a consumidores y las pérdidas de alimentos de las cadenas de producción (ONU, 2021).

Dentro del actual sistema jerárquico de recuperación de alimentos, las alternativas con mayor prioridad son la reducción en la fuente y la recuperación para el consumo humano. La primera de estas se define como un conjunto de acciones para disminuir los excedentes de alimentos y así evitar la generación de desperdicios y pérdidas. Uno de los enfoques mencionados para esta fase es el impulso y ampliación del procesamiento o transformación con valor agregado, el cual busca el aprovechamiento de subproductos (CCA, 2017).

Ante tal situación, en el país se creó la Red Costarricense para la Disminución de Pérdida y Desperdicio de Alimentos, la cual está conformada por diversos interesados del Sistema Agroalimentario Nacional, tanto a nivel público como privado. Esta iniciativa busca participar en procesos de investigación, sensibilización, educación y alianzas para tratar de convertirse en una red de apoyo en el avance de seguridad alimentaria y el robustecimiento de un sistema alimentario más sostenible e inclusivo (Chinchilla Bravo, 2020).

2.2.2 Aprovechamiento de residuos

La problemática de los residuos ha sido un tema recurrente; no obstante, en la actualidad las cantidades generadas alrededor del mundo se han acumulado por la rapidez de producción a gran escala de algunos productos, así como por sus características fisiológicas, es decir, lenta descomposición, lo cual genera

problemas ambientales por la lenta reincorporación de estos a los ciclos naturales (García Batista, Quevedo Guerrero y Socorro Castro, 2020).

El apoyo de inversión para desarrollo de proyectos donde se aprovechen los residuos agroindustriales ha aumentado, ya que es una de las industrias que más genera a partir de la cosecha y procesamiento de los diferentes productos (Cabrera Rodríguez, León Fernández, Montano Pérez y Dopico Ramírez, 2016). Según estudios se han encontrado variedad de aplicaciones de los residuos agroindustriales, con la idea de dar un valor agregado y mejorar la economía en las regiones, algunos ejemplos son los siguientes: obtención de pectina, xilitol y ácido acético, elaboración de papel y biomateriales, extracción de metabolitos fermentables, obtención de aceites esenciales y antioxidantes, generación de energía renovable y uso en alimentación animal y del suelo (Rojas González, Flórez Montes y López Rodríguez, 2019).

Cury, Aguas, Martínez, Olivero y Chams (2017) mencionan que algunos alimentos han sido foco de investigación e iniciativas de proyectos, entre estos se encuentran:

- Hongos comestibles: esta clase de alimentos son una alternativa para el aprovechamiento de residuos cuando se cultivan, tal es el caso de los hongos *Pleurotus ostreatus*, sobre los cuales se han encontrado estudios donde se utilizan residuos sólidos como base de su cultivo, debido a que se desarrollan sobre materiales fibrosos como troncos, ramas o bagazos. El hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) es conocido por tener la capacidad de transformar parte de los desechos orgánicos agroindustriales en variedad de materiales como celulosa, lignina y hemicelulosa, por lo que se utilizan residuos como papel y caña de azúcar para su cultivo.
- Enzimas: se ha desarrollado la implementación de mezclas enzimáticas como papaína, celulasa y peptinasa para lograr la degradación de las membranas y paredes celulares de frutas y verduras, de esta manera se facilitan los procesos para extraer aceites y compuestos fenólicos; además, de los desechos de mariscos se puede obtener quitina y quitosano mediante enzimas naturales o generadas por el microorganismo.

La valorización de las agroindustrias ha evolucionado, y aspectos económicos y de producción se encuentran en el mismo plano que el ambiental, por lo que es necesario procurar un desenvolvimiento continuo. Al respecto, Cury, Aguas, Martínez, Olivero y Chams (2017) señalan que: “procurando el desarrollo creciente de una consciencia social que obliga a no producir a costa del planeta, sino de una manera sostenible”.

2.2.3 Experiencias en la reducción de pérdidas y desperdicios de alimentos y el aprovechamiento de subproductos

Ante el panorama actual, muchas organizaciones a nivel mundial han puesto en marcha diversas estrategias que buscan colaborar con la disposición de los residuos. En la región latinoamericana se han desarrollado proyectos con visiones sostenibles, tales son los casos de Global Foodbanking Network, una organización sin fines de lucro encargada de brindar apoyo a bancos de alimentos por medio de capacitaciones relacionadas con el manejo de estos y la recuperación de los alimentos en la industria (Global Foodbanking Network, 2021).

Otra alternativa es Disco Soup, un movimiento que busca concientizar sobre el aprovechamiento de alimentos considerados desperdicio; la idea central consiste en hacer una reunión festiva de la comunidad donde voluntarios recolecten los residuos en mercados y los preparan, creando un evento con música y con una razón social de fondo (Disco Soup, 2021).

Otro proyecto a nivel regional es la producción de biogás por medio del aprovechamiento de residuos post cosecha como alternativa a los combustibles fósiles. Su uso trae beneficios como mejoras de las condiciones ambientales sanitarias, control de la contaminación y generación de sistemas productivos integradores y eficientes. Países como Brasil tienen proyectos relacionados ya en desarrollo y anualmente tratan alrededor de 16 000 toneladas de residuos, las cuales producen un total de 319 000 metros cúbicos de gas al año (FAO, 2015).

III. MARCO METODOLÓGICO

En este capítulo se explicarán las diversas metodologías que se desarrollaron en el presente estudio. Se han tomado en cuenta diferentes tipos de análisis, los cuales se llevaron a cabo tanto en la cascarilla de cacao en su forma original, como mezclada con diversas matrices en infusiones.

3.1 Enfoque y tipo de investigación

Este trabajo se desarrolló con enfoque mixto, mediante investigación de tipo experimental y documental, con variables cuantitativas y cualitativas, dado que se analizaron las características de un subproducto tanto empíricamente al observar lo que ocurre en situaciones controladas, como con la revisión de libros, artículos, revistas, entre otros.

En el desarrollo de los objetivos específicos 1 y 2 se obtuvieron resultados cuantitativos. En el objetivo 1 se evaluaron parámetros microbiológicos y toxicológicos en la cascarilla de cacao, con el fin de controlar el proceso del subproducto y asegurar la inocuidad del procesamiento de la materia prima. En el objetivo 2 se analizaron las características fisicoquímicas de la cascarilla; en este caso, se tomaron en cuenta aspectos como la tipificación del grano de cacao y el tipo de procesamiento que pueden influir en los resultados obtenidos por otros autores. En el objetivo 3 se desarrolló un grupo focal preliminar para captar la percepción de posibles consumidores sobre las combinaciones a elegir para testear con el análisis sensorial de panel experto. De esta manera, se obtuvo datos cualitativos con variable discreta que respaldan la observación de los gustos sobre infusiones por parte de los potenciales consumidores de bebidas. Además, para la selección de las variables se tomaron en cuenta una prueba experimental por criterio experto de la autora y la consulta a una persona experta en temas de infusiones. Como introspectiva de la propuesta final de infusión, el grupo focal final se desarrolló en el objetivo 4, en el cual se obtuvieron las percepciones, críticas, ideas de mejora, reacciones, opiniones, etc, por parte de los participantes. Asimismo, se realizó una encuesta al potencial consumidor para obtener datos cuantitativos, dado que se considera bajo el enfoque mixto.

3.2 Sujetos y fuentes de información

El sujeto sometido a investigación en este estudio es la cascarilla de cacao, el cual representa el 20 % del volumen de producción semanal en la planta de cacao donde se tomó la muestra. Mediante este estudio se busca validar su aplicación en infusiones con otras materias primas que complementen en aspectos nutricionales.

Las fuentes de investigación del proyecto fueron primarias, por ejemplo, los grupos focales que se desarrollaron para obtener una evaluación de parámetros sensoriales de las posibles mezclas en las infusiones. Además, se realizó un análisis sensorial de la propuesta de infusión final, con personas consumidoras en un rango de 20 a 50 años, así como una entrevista a potenciales consumidores de bebidas con un perfil de 18 años a 75 años, residentes de Puriscal, a los cuales se les aplicó un cuestionario en línea. Como cuarta fuente de información primaria, se tuvo el criterio del panel sensorial para la degustación de las diferentes variables de infusiones. En cuanto a otras fuentes primarias, corresponde a las diferentes referencias citadas en este documento, tales como artículos de revistas, libros y comunicaciones personales.

Debido a que la presente investigación es mixta, se contó con diversas fuentes secundarias y terciarias a lo largo de su realización, dentro de estas se contemplan las bases de datos de la UTN, estudios del Gobierno, reglamentos, leyes, etc.

3.3 Pregunta generadora

¿Cuál es el potencial de la cascarilla de cacao para su aprovechamiento tecnológico en infusiones?

3.4 Variables

Tabla 3

Definición y operacionalización de variables

Objetivo específico	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Definición instrumental
Verificar la idoneidad del proceso de obtención de la cascarilla de cacao para su uso como materia prima en la elaboración de infusiones mediante análisis de laboratorio microbiológicos y de toxinas.	Características microbiológicas y toxicológicas de la cascarilla de cacao: - <i>Salmonella spp</i> - <i>Escherichia coli</i> - Aflatoxinas	Cuantificación de parámetros microbiológicos y de toxinas que permitan determinar la inocuidad de la cascarilla de cacao como materia prima.	Diseño y ejecución de pruebas para la obtención de cascarilla bajo óptimas condiciones de inocuidad verificadas, mediante análisis microbiológicos y toxicológicos (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp</i> y aflatoxinas).	- Métodos: 1. Determinación de <i>Escherichia coli</i> mediante el método AOAC 991.14, AOAC 998.08, AOAC 986.33, AOAC 989.10. 2. Determinación de <i>Salmonella spp</i> mediante el método VIDAS-Easy SLM de la casa Biomerieux. 3. Determinación de aflatoxinas mediante el método ELISA. - Equipos e instrumentos de laboratorio. - Bitácora de observación de procesamiento de cascarilla.

<p>Determinar las características nutricionales de la cascarilla de cacao por medio de análisis fisicoquímicos y sistematización de información de estudios previos para el ajuste de la aplicación.</p>	<p>Características fisicoquímicas de cascarilla de cacao:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Humedad - Grasa - Cenizas - Proteína - Fibra 	<p>Cuantificación de parámetros fisicoquímicos y bromatológicos que reflejan la composición de la cascarilla de cacao.</p>	<p>Análisis de laboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Humedad - Grasa - Cenizas - Proteína - Fibra cruda <p>Revisión de estudios previos como referencia.</p>	<p>- Métodos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinación de humedad mediante método gravimétrico, referencia AOAC 925.19. 2. Determinación de grasa mediante método extracción de soxhlet, referencia AOAC 963.15. 3. Determinación de cenizas mediante método gravimétrico, referencia AOAC 923.03. 4. Determinación de proteína mediante método Kjeldahl, referencia AOAC 950.48. 5. Determinación de fibra cruda
--	--	--	---	---

<p>Analizar la aplicabilidad de la cascarilla de cacao en diferentes mezclas herbales mediante ensayos experimentales para la formulación de prototipos de infusiones con alto valor nutricional.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mezclas de matrices. 2. Características de las matrices de infusiones: <ul style="list-style-type: none"> - Parámetros sensoriales. - Parámetros fisicoquímicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Posibles combinaciones de ingredientes aromáticos de infusiones en las que sea posible aplicar la cascarilla como materia prima. - Atributos sensoriales que caracterizan 	<ul style="list-style-type: none"> - Grupo focal preliminar. - Mediante la aplicación de los siguientes análisis de laboratorio: pH, acidez y brix. Además de pruebas sensoriales de panel de criterio experto. 	<p>mediante técnica de bolsa de filtro.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Equipos e instrumentos de laboratorio. - Investigaciones o estudios previos de cascarilla de cacao según referencias. - Bitácora de pruebas de laboratorio. - Guía para grupo focal. - Investigaciones o estudios previos de posibles variables según referencias. - Bitácora de prueba experimental de criterio experto por parte de la autora.
---	---	--	---	---

las mezclas de matrices.
 - Cuantificación de los parámetros fisicoquímicos que caracterizan las propuestas de infusiones.

- Análisis de perfiles sensoriales.
- Bitácora de pruebas de laboratorio.
- Métodos:
 1. Determinación de grados brix mediante método refractométrico.
 2. Determinación de pH mediante método potenciométrico, referencia AOAC 918.12.
 3. Determinación de acidez titulable mediante método potenciométrico.
- Guía para grupo focal.
- Encuesta de escalas.
- Determinación de capacidad antioxidante mediante método lector de microplacas.

Validar la aplicación de la matriz seleccionada del subproducto de cacao mediante análisis sensoriales y encuesta a potenciales consumidores para su evaluación como

1. Formulación seleccionada de matrices.
2. Caracterización a nivel nutricional:
 - Antioxidantes totales

- Matriz seleccionada a base de cascarilla de cacao con mejores propiedades funcionales y características organolépticas.

- Grupo focal final.
 - Análisis al consumidor sobre intención de consumo y conocimiento del producto.

alternativa de valor
agregado y
comercialización.

- La actividad
antioxidante
busca
encontrar cuál
es la
capacidad de
inhibir la
degradación
oxidativa y
aportar
mayores
características
nutricionales al
producto.

- Aplicación
de análisis
de
antioxidante
s totales.

Fuente: Elaboración propia.

3.5 Población y muestra

La población de dicho estudio es de 20 kg de producción de grano de cacao semanal. El 20 % de este producto corresponde a la cascarilla de cacao, es decir 4 kg por semana de este residuo.

La muestra de este estudio estuvo conformada por 3 lotes de las producciones semanales, de 2 kg totales. A esta muestra compuesta se le realizó una única repetición de análisis microbiológicos y de toxinas para validar el correcto control del procesamiento de la cascarilla; una vez determinada su idoneidad, esta fue caracterizada mediante análisis fisicoquímicos por triplicado.

La selección de las matrices se hizo con base en los resultados obtenidos del grupo focal preliminar conformado por seis consumidores de bebidas, donde se compartieron los criterios acerca de los parámetros organolépticos de cada una de las infusiones, la consultoría a un experto en infusiones, las tendencias de consumo, las propiedades funcionales, además de sabores y aromas que por criterio experto se encontró una buena combinación que no opaca el sabor de la

cascarilla. Estas tres matrices seleccionadas del objetivo 3 fueron analizadas tomando en cuenta algunos parámetros fisicoquímicos y un panel para el estudio del perfil sensorial que se aplicó a quince estudiantes semientrenados de la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas.

En el caso del objetivo 4, la población elegida corresponde a adultos de 18 a 75 años, potenciales consumidores de bebidas, residentes del cantón de Puriscal. El tamaño de la muestra fue de 380 individuos. Para el objetivo 4, se realizaron dos grupos focales de siete personas cada uno; y para buscar homogeneidad se definió como rango etario desde los 18 a los 60 años. Cada uno de los grupos fue conformado por personas de perfiles diversos y cada una de las sesiones en modalidad presencial se realizaron por separado.

Para los análisis descritos anteriormente los cuales constaron de degustación de las muestras de infusiones como es el caso del grupo focal preliminar, panel sensorial y grupo focal final se utilizó una muestra con una proporción de 60% cascarilla, 40% variable, esta mezcla correspondió a 7,2 g de cascarilla de cacao y 4,8 g de la variable en un litro de agua.

3.6 Descripción de la metodología

El subproducto analizado en este trabajo normalmente es desechado una vez que el productor obtiene las partes comúnmente utilizadas del fruto, por lo que se propuso aprovecharlo en infusiones, validando diversas variables para determinar la viabilidad del producto para consumo humano. A continuación, se detalla la metodología utilizada en cada uno de los objetivos específicos de la presente investigación.

3.6.1 Objetivo específico 1

La cascarilla de cacao representa un subproducto que en la actualidad es desaprovechado por los productores a pesar de sus cualidades a nivel nutricional, las cuales han sido estudiadas hace varios años. Una vez identificada la problemática, se realizó una visita a una planta productora de cacao artesanal que facilitó el subproducto con el objetivo de observar las condiciones del proceso, desde la cosecha hasta la hora de la obtención de la materia prima.

La muestra por analizar se conformó de varios lotes de cascarilla previamente obtenidos por el productor, conocida como “muestra compuesta”. Esta fue almacenada algunos días para después practicar una inspección visual antes de llevar a cabo los estudios tanto microbiológicos: *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, como de toxinas, examinando específicamente aflatoxinas totales con el objetivo de evaluar su idoneidad como materia prima para consumo humano en la elaboración de infusiones. A continuación, se detallan los métodos utilizados en los análisis mencionados.

3.6.1.1 Determinación de Salmonella mediante el método VIDAS - Easy SLM de la casa Biomerieux

Este análisis de *Salmonella spp* se llevó a cabo por un laboratorio externo siguiendo la metodología predeterminada “Determinación de presencia o ausencia de *Salmonella spp* mediante método VIDAS – Easy SLM (SupliLab S. A., 2021). El primer paso fue la toma y recepción de la muestra, de acuerdo con la referencia interna PT-05 (Muestreo y custodia de muestras). La muestra, mientras se inicia su proceso, se tuvo que mantener en refrigeración a una temperatura entre 5 °C a 6 °C.

Como segundo paso, se introdujeron los datos de la tarjeta MLE ya que pertenecía a un nuevo lote, las especificaciones (o datos de la curva base de calibración) fueron introducidas en el sistema Vidas® con la ayuda de la tarjeta de lote patrón MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada caja. Si esta operación no se efectúa antes de comenzar los tests, el sistema no podrá editar los resultados; estas especificaciones se introducen solo una vez para cada lote. Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.

En el tercer paso se llevó a cabo la calibración, utilizando el estándar suministrado en la caja, y debe efectuarse con cada nuevo lote que se abra, después de introducir las especificaciones del lote patrón. Se llevó a cabo una recalibración cada 14 d, y esta operación permite ajustar la curva de calibración a cada aparato y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo. El estándar,

identificado por S1, fue analizado por duplicado. El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV (Relative Fluorescent Value) fijados; si no es así, la media no será memorizada: se repitió una calibración.

Una vez que se efectuó la etapa previa, se procedió con el cuarto paso que corresponde a la preparación de la muestra de la materia prima; este proceso se detalla a continuación:

1. Se pesaron 25 g de la muestra de forma aséptica en una bolsa estéril.
2. Se adicionaron 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento no selectivo tal y como recomienda el BAM-FDA (agua peptonada).
3. Se colocó la muestra en el homogenizador por 2 min a velocidad media.
4. Se incluyó en el proceso de análisis cepas control para Salmonella BT-02 o BT-14, así como un control negativo de medio, las cuales se correrán en forma paralela a las muestras hasta el final.
5. Se incubaron entre 16 h a 22 h a (35 ± 1) °C.
6. Una vez transcurrido el tiempo, se tomaron 0.1 mL del caldo de enriquecimiento (6.2.4) y fueron colocados en un tubo de caldo SX2 de 10 mL.
7. Se incubó el tubo entre 16 h a 22 h a (42 ± 1) °C.
8. Tras la incubación con enriquecimiento selectivo, se homogenizó el tubo de caldo SX2 mediante un Vortex por 30 s.
9. Se colocaron 500 μ L del caldo SX2 previamente homogenizado del tubo referenciado en la cinta VIDAS y colocó en el equipo Heat and Go precalentado a 135 °C por (15 ± 1) min y luego se bajó a 95 °C.
10. Una vez transcurrido el tiempo, se dejó enfriar por al menos 10 min.
11. Se colocó la cinta en el equipo VIDAS al menos 30 min antes de su uso. El equipo debe haber sido calibrado de acuerdo con el fabricante y con la información de la muestra. Nota: El caldo SX2 sin calentamiento se puede conservar 72 h en refrigeración entre 2 °C a 8 °C antes de realizar la prueba. La confirmación debe realizarse a no más de 72 h de la finalización de la prueba.

12. Se inició el equipo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
13. Transcurrido el tiempo, se tomó el reporte de las muestras y se verificaron los resultados. El cálculo obtenido para cada muestra por el equipo está dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de la prueba} = \frac{\text{RFV muestra}}{\text{RFV estándar}}$$

Ausencia de *Salmonella spp* < 0,23

Presencia de *Salmonella spp* ≥ 0,23

Los resultados por debajo del umbral del método (< 0.23) indican que la muestra no contiene antígenos de *Salmonella* o contiene antígenos por debajo del umbral de detección. Los resultados por encima del umbral del método (≥ 0.23) indican que la muestra contiene antígenos de *Salmonella*.

Los resultados no son válidos cuando:

- La lectura de ruido de fondo es mayor a un valor determinado de corte, lo que indica contaminación del sustrato. En este caso, repita con el caldo calentado o el reactivo correspondiente (S1, C1, C2).

- No hay estándar para el número de lote del cartucho usado

Todos los resultados considerados como presuntos positivos deben ser confirmados por el método de cultivo. Proceda a la confirmación de los caldos positivos, la cual debe darse dentro de las 72 h posteriores a la finalización de la incubación, manteniendo el caldo SX2 en refrigeración entre 2 °C a 8 °C.

En el quinto paso se realizó el aislamiento de *Salmonella spp* del tubo de segundo enriquecimiento (SX2), mantenido entre 2 °C a 8 °C por no más de 72 h. Luego, se rayó la muestra y los controles positivos y negativos en dos agares selectivos XLD y Hektoen. Se puede utilizar Agares Cromogénicos para *Salmonella spp* como medio diferencial, entre ellos Agar ASAP. Seguido se incubaron las placas entre 24 h a 48 h a (35 ± 1) °C; y posteriormente se

examinaron las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella spp.*, de acuerdo con las siguientes características:

- Agar Hecktoen: colonias verdes o azul-verdosas con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

- Agar XLD: colonias rosas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

- Agar cromogénico ASAP: colonias rosas a moradas con halo del mismo color.

En caso de no tener colonias, se debe incubar por 48 h y observar. Cuando se mantienen las colonias atípicas, se pican dos o más de esas colonias para realizar pruebas bioquímicas o inmunológicas.

El sexto paso consta de la identificación bioquímica, primero seleccionaron al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo que se encuentren bien aisladas. Se tocó ligeramente el centro de la colonia sospechosa con una aguja de inoculación estéril, luego se llevó a cabo la inoculación del TSI en el fondo por punción y en la zona inclinada por rayado y, teniendo en cuenta no llegar al fondo del medio. Seguidamente, sin flamear, se inoculó la zona del fondo del tubo de medio LIA por punción de dos veces y luego rayando la zona inclinada. Se procedió a guardar las colonias picadas en el agar entre 5 °C a 8 °C; una vez realizado este proceso, se incubaron por (24 ± 2) h a (35 ± 2) °C. Se almacenaron en refrigeración entre 5 °C a 8 °C las placas con medios selectivos por si es necesario retomar más colonias.

Una vez pasado el tiempo, se observó el crecimiento en los tubos y se consideraron presuntivamente positivas para *Salmonella spp.* las colonias que den las siguientes reacciones:

- Agar TSI: en el fondo del tubo se observa viraje del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni

de la sacarosa. En la mayoría de los casos, se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

- Agar LIA: se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Se deben considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de *Salmonella spp* producen ácido sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

Se debe tomar en cuenta la retención de todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los agares TSI y LIA. Los cultivos con resultados en agar TSI que no parecen de *Salmonella spp.*, pero que presentan reacciones típicas en agar LIA, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que el agar LIA permitirá detectar *S. arizonae* y cepas atípicas de *Salmonella spp.* que utilicen lactosa o sacarosa.

Figura 4

Identificación bioquímica de *Salmonella spp* en la muestra

TSI			LIA		Suero polivalente		Disposición
Fondo	Inclinado	H ₂ S	Fondo	H ₂ S	O	H	
A	R	+	P	+	+	+	B & M. T.
A	R	+	P	+	+	-	B & M. T.
A	R	-	P	-			B & M. T.
A	R	-	A	-	+	+	B & M. T.
A	R	-	A	-	-	-	Descarte
A	R	+	A	+/-			B & M. T.
A	A	-	A o P	-			Descarte
A	A	+	P	+			B & M. T.
NC	NC						Descarte

Fuente: SupliLab S. A. (2021).

Se deben descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios. Considerando las siguientes reacciones:

A: Amarillo, R: Rojo, P: Púrpura, B y M. T: Bioquímica y Prueba de Movilidad

Continuar el análisis a partir de los tubos de agar TSI con reacciones típicas. Si el cultivo presenta reacciones atípicas en este medio, tomar colonias adicionales de las placas de donde se obtuvo el cultivo atípico anterior y sembrar las pruebas bioquímicas nuevamente. El uso del citrato puede resultar de ayuda en casos de duda. Se pueden seguir adicionalmente los siguientes criterios, sumando el uso de la prueba de citrato.

Figura 5

Criterios por seguir para la identificación bioquímica de *Salmonella spp* en la muestra

	TSI	LIA	Citrato	
1	Típico	Típico	Positivo	Seleccionar
2	Típico	Típico	Negativo	Desechar
3	Típico	Atípico	Positivo	Seleccionar
4	Típico	Atípico	Negativo	Desechar
5	Atípico	Típico	Positivo	Seleccionar
6	Atípico	Típico	Negativo	Desechar
7	Atípico	Atípico	Positivo	Desechar
8	Atípico	Atípico	Negativo	Desechar

Fuente: SupliLab S. A. (2021).

Para dar cierre a la identificación bioquímica, se desarrolló el uso de un equipo automatizado como Vitek II System y la serológica a partir de los cultivos recuperados de agar TSI. Los resultados son expresados en términos de ausencia o presencia de *Salmonella spp.* en 25 g o 25 mL de muestra: *Salmonella spp.* Ausente / presente/ 25 g.

Tabla 4

Reactivos y materiales para la determinación de Salmonella spp mediante el método VIDAS - Easy SLM de la casa Biomerieux

Equipos y materiales	Reactivos
Balanza digital calibrada	Caldo de enriquecimiento primario, según BAM-FDA Agua Tamponada Buferizada Ref: 42043
Homogenizador de alimentos	Caldo de enriquecimiento SX2, 225 mL o 100 mL Ref: 42121
Equipo VIDAS, Biomerieux	Kit Vidas Salmonella SLM
Incubadora a (35 ± 1) °C	Cinta para Salmonella, VIDAS Ref: 30702
Incubadora a (342 ± 1) °C	Placas de agar XLD (MA-18)
Termoblock (heat and go) 95 °C a 10 °C	Placas de agar Hektoen (MA-41)
Agitador tipo vortex	Placas de agar cromogénico ASAP (MCE-28)
Pipetas automáticas de volumen variable para 0.1 mL a 1.0 mL	Agar Trypticase soya (MA-09)
Bolsas estériles para muestreo (ML-10)	Cepa de Salmonella thyphymurium ATCC 25241 (BT-02)
Materiales estériles para pesaje y preparación de la muestra (Cuchillos, cucharas, tenedores)	Cepa de Salmonella arizonae ATCC 13314 (BT-14) H2S negativa
Aguja bacteriológica (ML-34)	Suero poli O para Salmonella
Asa bacteriológica (ML-35)	Suero fagelar H
	Tubos de TSI (MA-21)
	Tubos de LIA (MA-19)
	Tubos de Agar Citrato (MA-49)
	API 20E (ML-31) o Vitek II

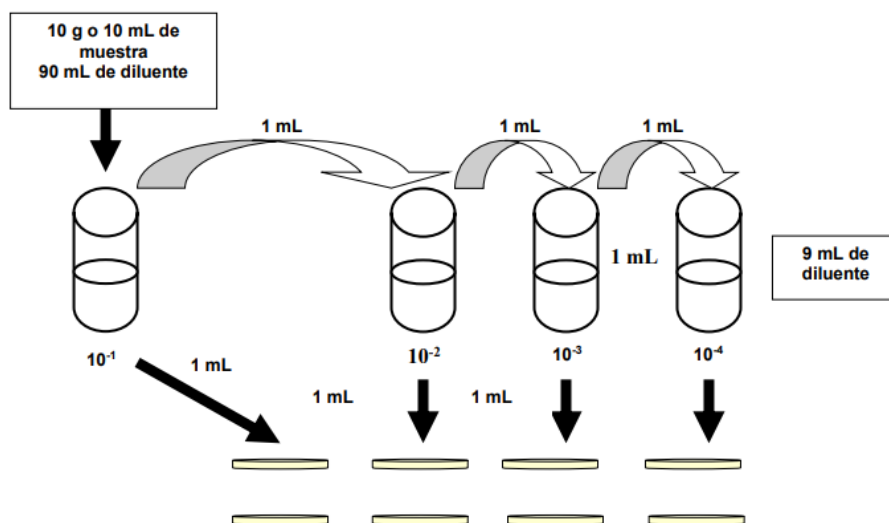
Fuente: SupliLab S. A. (2021).

3.6.1.2 Determinación de *E. coli* mediante los métodos AOAC 991.14, AOAC 998.08, AOAC 986.33 y AOAC 989.10

La metodología para el análisis de *Escherichia coli* fue la determinada por (SupliLab S. A., 2021) “Recuento de coliformes y *E. coli* mediante técnica de Petrifilm®”. En el primer paso de toma y recepción de muestra el procedimiento se realizó de acuerdo con PT-05 (muestreo y custodia de muestras). En el segundo paso se llevó a cabo la preparación de la muestra de acuerdo con el I-AT-22 (preparación de diluciones de muestras para análisis microbiológicos), considerando una dilución inicial de 10 g de la muestra en 90 mL de diluyente.

Figura 6

Flujograma para la determinación de recuento *E. coli* en alimentos



Fuente: SupliLab S. A. (2021).

Como en el siguiente paso se realizó el montaje de la muestra, se debe colocar la placa Petrifilm para recuento de *Escherichia coli* en una superficie plana y desinfectada. Se levantó el film superior y se colocó 1 mL de la muestra o su disolución en el centro del film inferior, se bajó con cuidado el film superior sobre la muestra con el fin de evitar que se formen burbujas de aire. Con la cara lisa hacia abajo, se colocó el aplicador en el centro de la placa y se presionó ligeramente el centro del aplicador para distribuir la muestra uniformemente.

Luego, se distribuyó el inóculo por toda el área de crecimiento del Petrifilm antes de que se forme el gel, no se debe deslizar el aplicador por el film; una vez realizado se sacó el aplicador y se dejó la placa en reposo durante al menos 1 min para que el gel se solidifique. Por cada dilución existente siembre en una o dos placas.

En un PetrifilmTM se inoculó una suspensión contable previamente preparada de *E. coli* como control positivo. En otro PetrifilmTM se inoculó un inóculo contable previamente preparado de una cepa Gram positiva como control negativo. Por último, se inoculó un PetrifilmTM con diluyente como control blanco. Las placas se incubaron en posición horizontal, cara arriba, las pilas pueden ser de hasta 20 placas. Paralelo se incubaron las placas Petrifilm para *E. coli* durante (48 ± 2) h a (35 ± 1) °C, según el método AOAC. 991.14.

Una vez realizada la inoculación, se procedió con el cuarto paso que corresponde al cálculo y expresión de los resultados, el recuento de las placas Petrifilm EC puede hacerse en un contador estándar de colonias u otra fuente de luz amplificada. Se debe tener presente no contar las colonias desarrolladas sobre la zona blanca, ya que no están bajo la influencia selectiva del medio y no contar las burbujas presentes debidas a artefactos.

Se enumeran las colonias azules a rojo-azulado asociadas a gas atrapado, independientemente del tamaño o intensidad de color, como *E. coli* confirmados. Las demás colonias de coliformes serán rojas y asociadas a burbujas de gas; las colonias azules sin gas no se cuentan como *E. coli*. El área de crecimiento circular del Petrifilm es aproximadamente de 20 cm², se realizan estimaciones en placas que contengan más de 150 colonias, contando el número de colonias en una o más cuadrados representativos, y obteniendo el promedio. Luego se multiplican dicho número por 20 para obtener el recuento total por placa.

Las placas Petrifilm EC con una cantidad de colonias Muy Numerosa para Contar (MNPC) tienen una o más características siguientes:

- Muchas colonias pequeñas.
- Muchas burbujas de gas.

- Oscurecimiento del color del gel.

Altas concentraciones de *E. coli* causan que el área de crecimiento se vuelva azul, mientras que altas concentraciones de coliformes (no *E. coli*) causan que el área de crecimiento se torne de un rojo oscuro, cuando esto ocurre, se diluye más la muestra para obtener un recuento más preciso. Si se requiere, las colonias pueden aislarse para una posterior identificación.

Se levantó el film superior y se selecciona la colonia del gel. El análisis se debe hacer siguiendo los métodos estándar, si no es posible realizar el recuento después de terminada la incubación, las placas pueden conservarse en congelación a temperaturas bajo o igual a los $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un máximo de una semana para efectuar el conteo. Esto es solo para casos de emergencia, no se debe establecer como procedimiento rutinario.

Como último paso, se realizó el cálculo e informe de los recuentos en placa, así que se seleccionaron las que presenten un rango de conteo entre (15 a 150) colonias, para el método AOAC 991.14. Para el recuento de *E. coli* en muestras diluidas, los valores se informarán de acuerdo con el número entero que se obtuvo sin cambios y sin aproximaciones (ejemplo: 333, 90, 16, etc.). En el caso de valores que se obtuvieron sobre o bajo el rango, deben ser informados como Recuento Estimado en Placa (RESP), y en caso de recuentos incontables se informan como Muy Numeroso Para Contar (MNPC).

En los casos donde no se obtuvo un desarrollo en las placas, se informa según el límite de detección de la técnica, en este caso:

$< 10\text{ UFC / mL /g}$: Muestras en dilución 10^{-1} .

Tabla 5

Reactivos y materiales para la determinación de E.coli mediante los métodos AOAC 991.14, AOAC 998.08, AOAC 986.33 y AOAC 989.10

Equipos y materiales	Reactivos
----------------------	-----------

Balanza granataria calibrada ± 0.1 g	Placas de Petrifilm® para recuento coliformes/E coli 3M
pH-metro calibrado	Agua peptonada bufferizada al 0.1 %
Incubadora a (35 ± 1) °C	Agua buffer de fosfato
Pipetas automáticas de volumen variable para 0.1 mL a 1.0 ML	Cepas control de <i>E coli</i>
Bolsas estériles	

Fuente: SupliLab S. A. (2021).

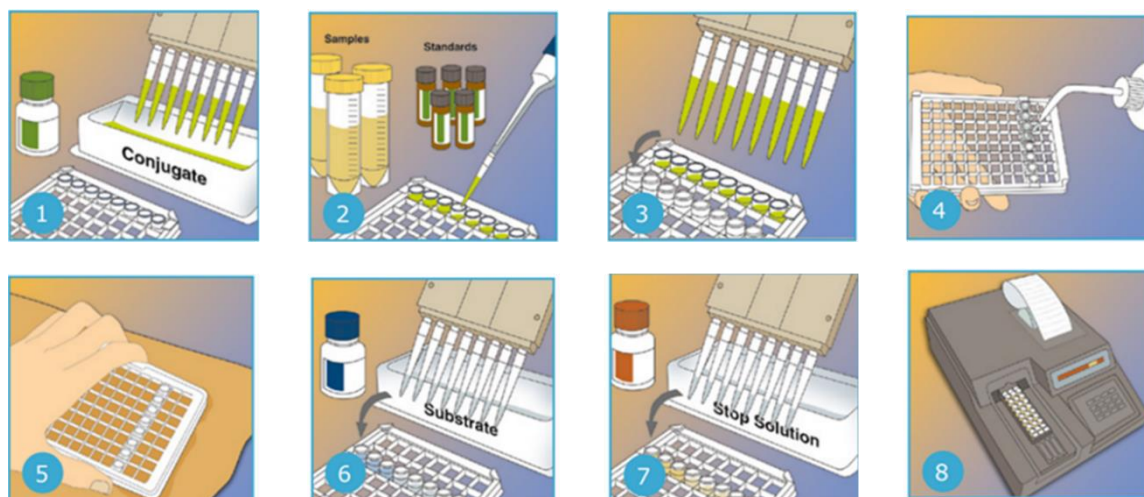
3.6.1.3 Determinación de aflatoxinas mediante el método ELISA

Los kits de prueba de aflatoxina total de AgraQuant son ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), se puede aplicar una extracción universal de muestras utilizando una solución de metanol al 70 % para analizar seis clases de micotoxinas con ocho kits diferentes. Algunos kits aplican una dilución del extracto de muestra para reducir los efectos de la matriz. Después de combinar el extracto de muestra o calibradores y la toxina conjugada enzimática en el anticuerpo bien recubierto, la reacción competitiva tardó de 10 a 60 minutos (primera incubación). El lavado posterior eliminó los reactivos no unidos seguido de la adición de sustrato, a partir de lo cual se comienza una reacción de color que duró de 5 a 20 minutos (segunda incubación). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de micotoxinas en la muestra o estándar. Una solución de parada evita un mayor desarrollo de la reacción de color, lo cual permite mediciones reproducibles de la intensidad utilizando un lector de micropocillos. Los resultados interpretaron utilizando hojas de cálculo de Romer Labs.

Cada kit se encuentra compuesto por cinco o seis viales de cada estándar de aflatoxina, 48 o 96 micropocillos recubiertos de anticuerpos, 48 o 96 micropocillos de dilución codificados por colores, conjugado de aflatoxinas, solución sustrato y solución de parada. A continuación, se detallan las actividades llevadas a cabo para el desarrollo de esta metodología.

Figura 7

Paso a paso para la determinación de aflatoxinas mediante el método ELISA de AgraQuant®



Fuente: Romer Labs Division Holding GmbH (2011).

Como primer paso, se añadieron 200 μL conjugados en cada pozo de dilución codificado por colores. En el segundo paso, se agregó patrones de 100 μL o muestras al conjugado y se mezcló bien. El contenido de 100 μL de esta mezcla se transfirió a pocillos recubiertos de anticuerpos los cuales se incubaron durante 5-60 minutos. A continuación, el cuarto paso consistió en desechar el contenido de los pozos y lavar los pozos con agua desionizada o solución tampón. Luego, se secaron los pocillos con una toalla de papel y, posteriormente, se añadieron 100 μL de sustrato en cada pocillo y se incubaron durante 5-20 minutos. Transcurrido este proceso se añadieron 100 μL de solución de parada en cada pocillo. Los resultados fueron analizados utilizando un lector ELISA con filtro de 450 nm, este se programó eligiendo el ítem con las siguientes características:

Tabla 6

Características para el uso de ELISA con filtro 450nm

Ítem	Descripción	Número	Rango de cuantificación
------	-------------	--------	-------------------------

AgraQuant® Total Aflatoxin	96/48 pocillos	10002098 / 10002099	4-40 ppb
-------------------------------	----------------	---------------------	----------

Fuente: Romer Labs Division Holding GmbH (2011).

Tabla 7

Reactivos y materiales para la determinación de aflatoxinas mediante el método ELISA

Equipos y materiales	Reactivos
Molino Romer Serie II ® o equivalente	Kit ELISA de aflatoxinas totales de AgraQuant®
Licuada o frasco con cierre hermético	100 % metanol (grado ACS) metanol o 70 % metanol
Balanza	agua destilada o desionizada para preparar metanol al 70 %
Cilindro graduado 100mL	84 % acetonitrilo
Contenedor (min 125mL)	
Papel filtro Whatman#1 o equivalente	
Embudo de filtro	
Columna MycoSep 112 para matrices específicas	
Pipetas de 8 canales y monocanal 100µL y 200µL con puntas	
Toallas	
Tres recipientes de reactivos para pipetas de ocho canales	
Lector de micropocillos con filtro de 450nm y filtro diferencial a 630 nm	

Fuente: Romer Labs Division Holding GmbH (2011).

3.6.2 Objetivo específico 2

En la industria de alimentos es de suma relevancia contar con análisis de caracterización fisicoquímica a la hora de proponer el uso de una nueva materia prima en el mercado. Por esta razón, se efectuaron una serie de análisis proximales a la cascarilla de cacao por triplicado, tomando en cuenta variables tales como humedad, proteína, grasa, fibra cruda y cenizas, es de relevancia mencionar que para el análisis de los datos obtenidos se aplicaron las fórmulas de promedio y desviación estándar, tanto estas como los métodos utilizados se detallan a continuación.

$$\bar{x} = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n}{n}$$

Donde:

a_n : resultado de muestra.

n : total de muestras realizadas.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Donde:

\bar{x} (con línea arriba): promedio de muestras.

X_i : resultado una muestra.

N : total de muestras realizadas.

3.6.2.1 Determinación de humedad mediante método gravimétrico, referencia AOAC 925.19

Se preparó el material a utilizar, por lo que las cápsulas fueron sometidas a un proceso de secado en estufa durante al menos una hora a 100-105 °C. Como segundo paso, para el análisis de la muestra se pesó la cápsula y se registró la masa, sin tarar, y se colocaron 2g de muestra para registrar el peso. Como tercer

paso, se colocó la cápsula en la estufa a una temperatura de 105 °C, durante 4 horas. Una vez transcurrió el secado, se retiró la cápsula de la estufa y se dejó enfriar en el desecador de 30-45 min. Finalmente, se registró la masa de la cápsula y la muestra seca.

El contenido de agua se determinó por diferencia de peso y se expresa en % de humedad (g de H₂O/100 g de muestra). La fórmula para el cálculo de los resultados fue la siguiente:

$$\% \text{ de Humedad} = 100 \times \frac{Ma - Mb}{Ma - M}$$

Donde:

M: masa en gramos de la cápsula.

Ma: masa en gramos de la cápsula con la muestra.

Mb: masa en gramos de la cápsula con la muestra seca.

Tabla 8

Reactivos y materiales para la determinación de humedad mediante método gravimétrico, referencia AOAC 925.19

Equipos y materiales	Reactivos
Cápsulas	Muestra de cascarilla de cacao
Balanza analítica	
Estufa	
Desecador	
Pinzas	

Fuente: Estado Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 925.19 (1925).

3.6.2.2 Determinación de grasa mediante método extracción de soxhlet, referencia AOAC 963.15

Se inició pesando el beaker que forma parte del extractor, se taró y se incorporaron dos núcleos de ebullición por muestra y se registraron pesos. Se pesó un beaker y se taró para colocar el dedal (pieza del extractor de grasa), luego se volvió a tarar y se pesaron de 2 a 3 gramos de muestra. Seguidamente, se incorporaron a los beakers que contenían los núcleos de ebullición 70 ml del

solvente éter de petróleo. A continuación, se dejó correr el programa del extractor, el cual consta de la etapa de inmersión a una temperatura de 110 °C por 60 minutos; como siguiente fase, se realizó un lavado a la misma temperatura de 110 °C por 60 minutos. Finalmente, se llevó a cabo el proceso de recuperación por un tiempo estimado de 30 minutos, sin embargo, se tuvo que monitorear la muestra para que una vez el solvente se haya eliminado se detuviera el extractor. Luego, se realizó el secado del extracto en una estufa a 105 °C por 30 minutos, y se dejó enfriar antes de pesar las muestras. La expresión del resultado se refiere a la muestra húmeda pesada como g/100g y se obtuvo con la fórmula:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{W_2 - W_1}{M_1} \times 100$$

Donde:

W2: beaker + núcleo de ebullición + muestra final.

W1: beaker + núcleo de ebullición.

M1: muestra inicial.

Tabla 9

Reactivos y materiales para la determinación de grasa mediante método extracción de soxhlet, referencia AOAC 963.15

Equipos y materiales	Reactivos
Estufa	Solvente éter de petróleo
Balanza	Material biológico
Extractor soxhlet	
Horno	
Pinzas	
Beaker	
Núcleos de ebullición	

Fuente: Estados Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 963.15 (1973).

3.6.2.3 Determinación de cenizas mediante método gravimétrico, referencia AOAC 923.03

Primero, se preparó el material, por lo que se lavaron los crisoles y se llevaron a la estufa por 1 hora a un rango de temperatura de 105 °C, después se sacaron

manipulándolos siempre con pinzas y se dejaron en el desecador enfriar hasta que estuvieran a temperatura ambiente. A continuación, se pesó el crisol y se registró su masa, sin tarar la balanza se colocó una muestra de 3 a 5 g y se registró el peso; seguidamente se colocó el crisol con la muestra en la mufla por 4 horas a 600 °C. Concluido el programa, se apagó la mufla y se dejaron enfriar las cenizas obtenidas, se retiraron los crisoles de la mufla con pinzas y se dejaron enfriar en desecador a temperatura ambiente. Una vez enfriada la muestra, se pesó el crisol con la muestra obtenida y se registró la masa. Los resultados se obtuvieron por diferencia de peso y se expresaron en % de cenizas (g/100g) según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = 100 \times \frac{M2 - M0}{M1 - M0}$$

Donde:

M0: masa en gramos del crisol.

M1: masa en gramos del crisol más la muestra.

M2: masa en gramos del crisol más las cenizas obtenidas.

Tabla 10

Reactivos y materiales para la determinación de cenizas mediante método gravimétrico, referencia AOAC 923.03

Equipos y materiales	Reactivos
Crisoles	Material biológico
Pinzas	
Estufa	
Desecador	
Mortero	
Balanza analítica	
Mufla	

Fuente: Estado Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 923.03 (1990).

3.6.2.4 Determinación de proteína mediante método Kjeldahl, referencia AOAC 950.48

Con la ayuda de un papel para colocarlo en la balanza, se pesaron de 0,5 a 0,8 gramos por muestra, cada una se agregó a un tubo de ensayo debidamente rotulado, con dos pastillas de catalizador CM y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado al 98%. Luego, se colocaron los tubos de ensayo en el digestor, este proceso inició agregando al equipo 50ml de agua destilada y 50ml de hidróxido de sodio (NaOH), y tardó aproximadamente 60 minutos a una temperatura de 420 °C. Una vez finalizado, se dejaron enfriar los tubos de ensayo a una temperatura entre 50-60 °C. Posteriormente, se inició el proceso de destilación, se colocó en posición el tubo de ensayo con la muestra ya digerida y en la salida del equipo se colocó un erlenmeyer con 30ml de ácido bórico (H₃BO₃) al 4 % con mezcla de indicadores para que recolectara la muestra. Una vez terminada esta etapa, se tituló con HCl a una concentración de 0.2321N. El cálculo del porcentaje de proteína se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

Donde:

N: normalidad del HCl.

V: volumen gastado de HCl.

14: equivalente en gramo de nitrógeno.

F: factor.

Mg muestra: miligramos de muestra pesada.

Tabla 11

Reactivos y materiales para la determinación de proteína mediante el método kjeldahl, referencia AOAC 950.48

Equipos y materiales	Reactivos
Mortero	Catalizador CM
Tubo de borosilicato	Ácido sulfúrico (98 % concentración)
Bloque digestor	Ácido clorhídrico (HCl)
Destilador de nitrógeno	Muestra biológica
Congelador	Agua destilada

Erlenmeyer

Ácido bórico (H₃B₀₃)

Bureta

Hidróxido de sodio (NaOH)

Fuente: Estados Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 950.48 (1950).

3.6.2.5 Determinación de fibra cruda mediante técnica de bolsa de filtro

Inicialmente, se molió la muestra no muy fina, aproximadamente 2 mm por partícula, se rotularon las bolsas de filtro que se iban a utilizar en el análisis y se pesó y registró el peso de cada bolsa de filtro vacía. El tercer paso fue colocar de 0,95 a 1 g de muestra en cada una de las bolsas, este dato fue registrado; además se registró una bolsa vacía para determinar la corrección de blanco. El siguiente paso fue sellar cada una de las bolsas de filtro, se dejaron 4mm en la parte superior para que se encapsule bien la muestra. Como quinto paso, se extrajo la grasa de las muestras colocándolas en un envase de 250 mL de éter de petróleo. Se colocaron hasta tres bolsas en cada soporte, se apilaron las bandejas en el poste central del “bag suspender” con cada nivel girado 120° en relación con la bandeja debajo de ella; se colocó la novena bandeja vacía en la parte superior. Es necesario comprobar que el suministro de agua caliente está encendido y la manguera de drenaje está firmemente posicionada en el desagüe. Se debe leer el controlador de temperatura en el lado derecho del instrumento, si esta es más alta que 20 °C, se enfría el recipiente llenándolo con agua fría hasta que el controlador de temperatura se encuentre en 20 °C y ejecutar el procedimiento de purga para drenar el agua. Se fijaron todas las mangueras al contenedor a su puerto específico, el puerto A se utiliza para la disolución de ácido para fibra cruda, el puerto B se utiliza para la disolución de base para fibra cruda. Además, se abrió la tapa del recipiente y se insertó el soporte con las bolsas y fue colocada la pesa para el soporte de las bolsas en la parte superior de la novena bandeja vacía para mantener el soporte sumergido. A continuación, se eligió en las instrucciones del monitor ANKOM²⁰⁰⁰ la opción fibra cruda, se cerró la tapa del recipiente y se confirmó que el agua caliente estuviera encendida (>50 °C) para presionar iniciar. Cuando la extracción de fibra cruda y los procesos de lavado terminaron, se abrió la tapa del recipiente y se retiraron las muestras; se colocaron las bolsas en un beaker de 250 ml y se añadió una cantidad suficiente de acetona que cubriera las

bolsas, se dejaron remojar de 3-5 minutos. Transcurrido este tiempo se retiraron las bolsas de filtro y fueron colocadas en una malla de alambre para que se secaran al aire; se completó con un secado al horno a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$. Se retiraron las bolsas de filtro del horno e inmediatamente se colocaron en una bolsa desecante plegable y se aplanaron para eliminar el aire; se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se pesó cada una de las bolsas. Como paso final, se redujeron a cenizas toda la bolsa de filtro/muestra en un crisol previamente pesado durante 2 horas a $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 15\text{ }^{\circ}\text{C}$, se enfriaron en un desecador convencional y se pesaron para calcular la pérdida de peso de la materia orgánica. La fórmula utilizada para la obtención de los resultados finales fue la siguiente:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{100 \times (W_3 - W_1)}{W_2}$$

Donde:

W1: peso de la bolsa vacía.

W2: peso de la muestra.

W3: peso de la materia orgánica (pérdida de peso por ignición de la bolsa y fibra).

Tabla 12

Reactivos y materiales para la determinación de fibra cruda mediante la técnica de bolsa de filtro

Equipos y materiales	Reactivos
Balanza analítica	Disolución de ácido sulfúrico
Horno	Disolución de hidróxido de sodio
Digestor ANKOM ²⁰⁰⁰	Muestra biológica
Bolsas de filtro	
Sellador de calor	
Bolsa desecante	
Rotulador resistente a ácidos y disolvente.	

Fuente: Estados Unidos / Urbana, IL Patente n° AOCS (Ba 6a-05) (2017).

Una vez ejecutados los análisis, se compararán con estudios previos con el fin de robustecer el proyecto.

3.7.1 Objetivo específico 3

La cascarilla de cacao es tratada por la industria como un desecho biológico a pesar de representar un porcentaje muy amplio del fruto total, comúnmente lo poco que se aprovecha se destina a alimento animal, esto debido a que la población desconoce las cualidades nutricionales (macro y micronutrientes) que aporta. Dentro de las opciones de aprovechamiento en consumo humano se encuentran las infusiones, comúnmente este producto es de agrado para el consumidor y existen un sinnúmero de combinaciones que por su fuente aportan ciertos componentes de principios activos que benefician la salud de quienes lo adquieren. A raíz de lo expuesto para el abordaje de este objetivo, se establecieron una serie de formulaciones que fueron analizadas a nivel proximal y sensorial para determinar la aplicabilidad de la cascarilla en diferentes mezclas herbales y seleccionar el mejor prototipo de infusiones.

3.7.1.2 Grupo focal preliminar

Este grupo focal fue llevado a cabo con seis consumidores potenciales, los cuales evaluaron cinco diferentes opciones de mezclas en infusiones, considerando los siguientes parámetros sensoriales: olor, color y sabor. Para este análisis se tomaron en cuenta el jengibre, la canela, la hierbabuena, la manzanilla y la naranja deshidratada; todas conocidas por su diferente aporte nutricional.

Para llevar a cabo el grupo focal se utilizó como base una guía previamente diseñada (apéndice 7.3), donde el moderador guio la conversación para poder generar una conversación orgánica donde cada participante expusiera sus perspectivas. Una vez realizado este grupo focal se analizaron las percepciones de los individuos y, con base al puntaje que le asignó cada participante, se determinaron las tres mejores opciones ponderadas de prototipos por utilizar junto con la cascarilla de cacao.

3.7.1.3 Análisis fisicoquímicos en prototipos de infusiones

Las muestras de las mezclas seleccionadas se sometieron a análisis tales como grados brix, pH y acidez, es de relevancia mencionar que para el análisis de los datos obtenidos se aplicaron las fórmulas de promedio y desviación estándar, tanto estas como los métodos utilizados se detallan a continuación.

$$\bar{x} = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n}{n}$$

Donde:

a_n : resultado de muestra.

n : total de muestras realizadas.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Donde:

\bar{x} (con línea arriba): promedio de muestras.

X_i : resultado una muestra.

N : total de muestras realizadas.

3.7.1.3.1 Determinación de grados brix mediante método refractométrico

Como primer paso, se enjuagó el prisma con agua destilada, fue limpiado con papel filtro y con la ayuda de un gotero se colocó la muestra a analizar. Se observó la escala en el refractómetro y se anotó la lectura indicada, la cual es igual al °Brix de la muestra.

Tabla 13

Reactivos y materiales para la determinación de grados brix mediante método refractométrico

Equipos y materiales	Reactivos
Refractómetro Milwaukee MA871	Muestra
Papel filtro	Agua destilada
Gotero	

Fuente: Milwaukee Instruments, Inc (2020).

3.7.1.3.2 Determinación de pH mediante método potenciométrico, referencia AOAC 918.12

Se calibró el pHmetro y los electrodos con las soluciones referencia; luego, se tomaron muestras de 10 ml por cada alícuota de infusión, se dejó equilibrar por unos minutos y se leyó el pH de la solución directamente en el potenciómetro.

Tabla 14

Reactivos y materiales para la determinación de pH mediante método potenciométrico, AOAC 918.12

Equipos y materiales	Reactivos
pHmetro	Agua destilada
Electrodos	Muestra
Vaso de precipitado	Soluciones referencia

Fuente: Estados Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 918.12 (1997).

3.7.1.3.3 Determinación de acidez titulable mediante método potenciométrico

Se llenó una bureta con una solución de hidróxido de sodio al 0,1 mol/l, se tomó lectura de la cantidad de solución álcali de la bureta. El siguiente paso fue tomar 10 ml de muestra e introducirlos en un matraz Erlenmeyer, se adicionaron tres o cuatro gotas del indicador fenolftaleína y, a continuación, se colocó gota a gota hidróxido de sodio al mismo tiempo que se giraba el Erlenmeyer con la muestra lentamente. Cuando apareció el color rosa, se detuvo la titulación y se continuó

girando el Erlenmeyer durante 15 segundos para ver si el color permanecía; si este desaparecía, se debe de adicionar cada vez una gota extra de hidróxido de sodio, si el color permanece, se acaba la titulación. Se tuvo que tomar lectura de la bureta del gasto usado para neutralizar el valor de la muestra. La siguiente fórmula se utilizó para obtener los datos finales.

$$\% \text{ acidez} = \frac{(0,064) (\text{Normalidad de NaOH}) (\text{mL utilizados de NaOH})}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

Donde:

0,064: corresponde al factor.

Normalidad NaOH: 0,1N.

Tabla 15

Reactivos y materiales para la determinación de acidez titulable mediante método potenciométrico

Equipos y materiales	Reactivos
Bureta	Hidróxido de sodio 0.1M
Matraz Erlenmeyer	Fenolftaleína
Pinzas Fisher	Muestra

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización (1986).

3.7.1.4 Panel sensorial

Se llevó a cabo un panel de perfiles sensoriales utilizando como tipo de prueba la afectiva de preferencia por ordenamiento, con una escala de medición ordinal y una escala de respuesta tipo ranking. Este fue aplicado a 15 estudiantes semientrenados del curso Análisis sensorial de alimentos de la Universidad Técnica Nacional en el laboratorio de la universidad, el cual cuenta con la infraestructura ideal para la implementación de este tipo de pruebas, permitiéndonos llevarla a cabo bajo el ambiente y las condiciones ideales para la obtención de resultados válidos. La primera etapa se conformó tanto en planificar el tema logístico de la prueba, como la creación del cuestionario (apéndice 7.4) que se entregó y la forma de repartición de las muestras, en este caso el laboratorio

contaba con 4 ventanillas por lo que los estudiantes fueron ingresando según se iban finalizando el resto de los participantes. En la segunda fase se desarrolló la prueba donde se generaron los resultados y, como cierre, el análisis cuantitativo de los mismos tomando en cuenta la variable de varianza, la fórmula utilizada se detalla a continuación, dando como valor final el prototipo con mayor potencial para lanzar al mercado.

$$Var(X) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n}$$

Donde:

X: variable aleatoria de la que se busca calcular la varianza.

X_i : es el valor de dato i .

n: es el número total de observaciones.

\bar{X} (con línea arriba): es la media de la variable aleatoria X.

3.7.2 Objetivo específico 4

3.7.2.2 Encuesta al potencial consumidor

La metodología para el desarrollo de la encuesta se dividió en varias etapas. La primera fue identificar el problema del estudio, para esto se realizó un análisis de valor, el cual mediante preguntas ayudó a centrar el objetivo. En el segundo paso, se seleccionó la técnica, es decir el tipo de encuesta que se llevó a cabo. En la tercera etapa se diseñó la muestra mediante el uso de fórmulas estadísticas específicas; además, en esta etapa también se contempló el tipo de muestreo llevado a cabo y la técnica a utilizada. Hasta este punto, el proceso fue general, no obstante, a partir de la cuarta etapa se contempló el diseño del instrumento, por lo que fue necesario tomar en cuenta el nivel de medición, las técnicas de medición y la redacción de las preguntas, las instrucciones fueron lo último que se agregó al documento. En la quinta etapa se desarrolló la recolección de la información, donde se seleccionaron la forma de llevarse a cabo y se estableció un tiempo para obtener los resultados, mismos que se analizaron a nivel cualitativo.

3.7.1.2 Grupo focal final

El primer paso para desarrollar la metodología del grupo focal final fue definir el problema por el cual se deseaba realizar esta estrategia. La segunda fase constó de una segmentación de la población elegida para crear dos grupos focales, luego se encontró la elección de los participantes, quienes debían cumplir una serie de requisitos y podían ser tomados de diversos recursos. En la tercera etapa se planeó el diálogo que se tendría bajo el rol de moderador (apéndice 7.11), se consideró una buena visión general para que los participantes logaran una correcta fluidez en el intercambio de ideas e impresiones respecto al producto. En la cuarta etapa se llevó a cabo la metodología, la cual se realizó de forma separada cada una de las sesiones con ambos grupos. En la quinta etapa se analizaron los resultados tomando en cuenta todas las anotaciones tomadas durante el desarrollo del proceso, la finalidad fue comparar cómo se comportaron los diferentes segmentos tanto individualmente como entre ellos.

3.7.2.3 Determinación de capacidad antioxidante mediante lector de microplacas

La muestra de la infusión se centrifugó previo al análisis para evitar que los sólidos suspendidos interfirieran con la medición de absorbancia. La muestra centrifugada se diluyó de forma que la medición de absorbancia quedara dentro del ámbito de la curva de calibración.

Las disoluciones de la muestra y las disoluciones patrón de trolox se analizaron por lector de microplacas; a partir de las mediciones de absorbancia se determinó la concentración de equivalentes de trolox en la muestra original. La concentración fue reportada con un margen de error dado por la desviación estándar de las mediciones realizadas.

Tabla 16

Reactivos y materiales de la determinación de capacidad antioxidante mediante lector de microplacas

Equipos y materiales	Reactivos
Lector de microplacas	Disoluciones patrón trolox

Fuente: Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (2023).

3.8 Técnicas e instrumentos para recolección de información

Para la recolección de la información tanto cuantitativa como cualitativa en este trabajo se implementaron algunas técnicas e instrumentos conocidos en el ámbito de la investigación.

En el primer objetivo se utilizaron bitácoras para la documentación de la observación del proceso operacional actual y la de análisis microbiológicos y aflatoxinas. Para el desarrollo del segundo objetivo se usó la bitácora de laboratorio con el fin de documentar los resultados de la caracterización de la cascarilla de cacao.

La información obtenida del seguimiento de los resultados de análisis fisicoquímicos que se llevaron a cabo a las diferentes matrices de infusiones se obtuvo con el uso de una bitácora de laboratorio.

Para los grupos focales se utilizaron guiones y se obtuvo la grabación de la sesión y hojas de apuntes por parte del moderador que permitieron sustraer lo relevante a la hora de la interacción del producto con el consumidor. También se empleó el instrumento de la encuesta mediante un formulario en línea. Para el panel sensorial se utilizaron formularios de respuesta.

3.9 Técnicas de análisis de la información

Para el análisis de los datos se implementaron diversas técnicas. En el primer objetivo se llevó a cabo una comparación con la norma vigente, y se realizó un análisis operacional respaldado por los resultados de los análisis microbiológicos y de aflatoxinas que fue consultado con especialistas en el área de producción de alimentos. En el segundo objetivo se utilizaron medidas estadísticas tales como promedio y desviación estándar para el estudio de la información obtenida por parte de los análisis de proximales realizados a la cascarilla de cacao.

En el tercer objetivo se hizo un análisis cualitativo de los resultados del grupo focal y para los estudios fisicoquímicos desarrollados en las matrices de infusiones

se manejaron medidas estadísticas como promedio y desviación estándar. En el panel sensorial se empleó la técnica de análisis cualitativo respecto a los resultados reflejados. En el cuarto objetivo se desarrolló en el caso del grupo focal final un análisis cualitativo, y para la encuesta se implementó la interpretación de los resultados porcentuales.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación, se muestra el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, siguiendo la metodología expuesta, con el fin de determinar la aplicabilidad del subproducto cascarilla de cacao en infusiones.

4.1 Idoneidad del proceso de obtención de la materia prima

La materia prima analizada en este estudio es un subproducto obtenido del proceso de producción desarrollado en una planta de cacao artesanal. La muestra de cascarilla obtenida es el resultado de un procesamiento controlado bajo condiciones óptimas.

4.1.1 Análisis del procesamiento

En la etapa de fermentación, las semillas de cacao con mucílago son colocadas en una caja de madera por un periodo de cinco a seis días. Una vez retirado, a diferencia de un procesamiento industrializado, este se coloca en el túnel solar de secado. En este punto, los granos son mezclados durante varias veces al día, esto con la idea de obtener un resultado uniforme.

En este proceso una variable por considerar es la cantidad de humedad en la zona, lo cual puede aumentar la duración en cada una de las etapas anteriores, factores que se controlan solo en procesos industrializados. La determinación del fin del proceso de secado se da mediante una inspección visual según el estado de humedad del nib en el grano de cacao; posteriormente se realiza el tostado, el cual es un proceso que puede tardar de 25 a 30 minutos en un sartén previo a la fase de descascarillado del producto. Esta última etapa se realiza con la ayuda del molino, y la separación del nib de cacao y la cascarilla se ejecuta aprovechando la diferencia de pesos al caer mediante el uso de aire caliente.

4.1.2 Análisis microbiológicos y de toxinas

Con el fin de comprobar la inocuidad del subproducto obtenido de la producción de cacao bajo las condiciones detalladas, se creó una muestra compuesta de varios lotes del subproducto de cascarilla de cacao, esta tuvo un reposo de un par de semanas y luego recibió una inspección visual previa a los análisis

microbiológicos y toxicológicos. Esto permitió comprobar la ausencia de crecimiento de mohos en la superficie del producto.

Dada la naturaleza de la muestra, se determinaron una serie de peligros microbiológicos que según el Reglamento Técnico Centroamericano de Microbiología 67.04.50:17 Anexo Res. 402-2018 aplican para ingredientes que serán utilizados en infusiones, datos tomados como referencia sobre los límites de estos parámetros.

En el caso de la *Salmonella spp*, el cacao ha sido identificado como vehículo para esta bacteria, por lo que según el RTCA 67.04.50:17 debe ser reportado como “Ausencia en 25 gramos de muestra”. En el análisis llevado a cabo se verifica la ausencia de este patógeno en la cascarilla de cacao.

La *Escherichia coli* es propensa a aparecer en las muestras de cacao por contaminación cruzada, el rango establecido es de un máximo de 10 UFC/g según el RTCA 67.04.50:17, lo que concuerda con los datos obtenidos en el análisis realizado. Con la obtención de estos resultados a nivel microbiológico, representados en la tabla 17, es posible asegurar al consumidor un producto obtenido en un procesamiento estándar que cumple con los parámetros de inocuidad.

Tabla 17

Resultados de análisis microbiológicos a muestra compuesta de cascarilla de cacao

Parámetro	Resultado	
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	/25g
<i>Escherichia coli</i>	< 10	UFC/g

Fuente: Elaboración propia según resultados de laboratorio externo, 2022.

Como parte del control del proceso también se estableció el peligro químico de origen biológico aflatoxinas totales. De acuerdo con Coto (2017), este tipo de micotoxinas suelen ser producidas por hongos de los géneros *Aspergillus* y

Fusarium, y dentro de los alimentos que suelen atacar este tipo de contaminantes se encuentra el cacao.

En la tabla 18 se incluyen los resultados obtenidos en la muestra compuesta, la cual no sobrepasa el rango vigente y certifica que el subproducto no ha sido contaminado por esta toxina en el campo, durante la cosecha o en los lugares de procesamiento y almacenamiento. De esta manera, se certifica la inocuidad del subproducto a nivel toxicológico.

A nivel mundial el control de este parámetro se realiza a matrices de alimentos para consumo humano y animal. Los rangos de aceptación varían según el país, en Costa Rica, el monitoreo oficial de aflatoxinas se efectúa únicamente en granos importados, mientras que la regulación en productos producidos localmente es muy baja o inexistente (Coto, 2017). De esta forma se expone al consumidor, ya que el ingerir esta toxina en dosis bajas, medias o altas causa tanto efectos tóxicos en corto tiempo (agudos), como aquellos que pudieran manifestarse a los meses o años (crónicos), estos últimos son los más comunes (Martínez, Vargas del Río y Gómez Quintero, 2013).

Tabla 18

Resultados de análisis toxicológicos a muestra compuesta de cascarilla de cacao

Parámetro	Resultado	
Aflatoxinas totales	< 5	ppb

Fuente: Elaboración propia según resultados de laboratorio externo, 2022.

Pese a que según European Food Safety Authority (2022) en lugares con climas húmedos y cálidos son más propensas las formaciones de hongos *Aspergillus*, y esta fue determinada como una variable crítica del proceso, dentro de la muestra compuesta no se encontró presencia de aflatoxinas totales. Esto comprueba la idoneidad de la materia prima para uso como ingrediente en infusiones.

Según los resultados obtenidos, se concluye que el procesamiento de la materia prima ha sido el idóneo, validando de esta forma su uso como ingrediente inocuo en infusiones. No obstante, se recomienda la implementación de buenas prácticas

de manufactura (BPM) estandarizadas en el proceso de producción, además de un control más riguroso en el ámbito microbiológico y toxicológico para asegurar al consumidor que la obtención de este subproducto se genera en condiciones controladas que no llegarán a afectar su salud.

4.2 Caracterización de la cascarilla de cacao

Una vez determinado el óptimo uso del subproducto de cascarilla de cacao, se hizo una caracterización fisicoquímica tomando en cuenta análisis de humedad, fibra cruda, proteína, grasa y cenizas. Según Andrade Almeida, Rivera García, Chire Fajardo y Ureña Peralta (2019), estos parámetros pueden variar dependiendo de las condiciones atmosféricas en los que se cultive el fruto como temperatura y humedad del ambiente, y estos podrían afectar el contenido del grano de cacao.

En la tabla 19 se reportan los promedios de los resultados obtenidos en la evaluación proximal realizada a la cascarilla de cacao mediante diversos métodos enfocados en el análisis de alimentos.

Tabla 19

Resultados de análisis proximal a la cascarilla de cacao

Humedad (%)	Cenizas (%)	Fibra cruda (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
±ds	±ds	±ds	±ds	±ds
9.31	9.13	32.08	11.30	16.97
±0.67	±0.37	±1.72	±1.77	±0.64

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

La humedad obtenida en la materia prima analizada fue un promedio de 9.31 %, valor mayor al reportado en el estudio de Sangronis, Soto, Valero y Buscema (2014), quienes de igual forma buscaban la caracterización de la cascarilla de cacao con el fin de utilizarlo en infusiones. Estos autores obtuvieron un ≥ 5 %, resultado cercano al obtenido por Vivanco, Matute y Campo (2017) en la variedad nacional de un 8.74 %. Este es un indicador de que este parámetro puede variar según las condiciones del producto, por lo que en este estudio se toma en cuenta

que la cascarilla procede de un proceso post cosecha, donde el secado y tostado no se realiza de forma industrial, factores que influyen en el resultado obtenido.

En el análisis de cenizas desarrollado se reporta 9.13 % en promedio, esto refleja el contenido de minerales que aporta la cascarilla de cacao al consumirla. Este es un dato cercano al hallado en el estudio de Sangronis, Soto, Valero y Buscema (2014), quienes obtuvieron un rango de 7 a 8 %, y lejano de lo informado por Vivanco, Matute y Campo (2017), quienes reportan un promedio de 5 %.

En la investigación de Vivanco, Matute y Campo (2017) se reporta un promedio de fibra cruda de alrededor de 41.05 % en dos variedades diferentes de cacao. En el análisis llevado a cabo en el presente trabajo de investigación se ha encontrado un resultado inferior, con un promedio de 32.08 %. El consumo de alimentos altos en fibra aporta un sinnúmero de beneficios a la salud, tal y como lo explican Almeida, Aguilar y Hervert (2014), quienes además mencionan la poca inclusión de alimentos que la contengan en la dieta de la mayoría de la población.

El contenido de grasa encontrado en la cascarilla estudiada fue de un 11.30 %. Otros estudios como el de Vivanco, Matute y Campo (2017) reportan un promedio de 2.25 % en una de las variedades analizadas; sin embargo, Sangronis, Soto, Valero y Buscema (2014) reportan un 6 %. Por su parte, Andrade Almeida, Rivera García, Chire Fajardo y Ureña Peralta (2019) mencionan en su estudio que el contenido de grasa del cacao puede variar en el proceso de fermentación al que se sometan semillas de cacao, ya que puede influir disminuyendo el contenido en el subproducto.

Se obtuvo un valor de proteína en la cascarilla de 16.97 %, mayor al resultado obtenido en el estudio de Vivanco, Matute y Campo (2017), donde la variedad que obtuvo el porcentaje más alto fue de 8.75 %. Este dato es similar al reportado por Sangronis, Soto, Valero y Buscema (2014), pues según este estudio en comparación con otros trabajos de investigación el resultado se encuentra dentro del rango promedio de 13 a 20 %.

Tabla 20

Resultados de análisis proximales obtenidos por otros autores

Análisis	Vivanco, Matute y Campo (2017)	Sangronis, Soto, Valero y Buscema (2014)
Humedad	8.74 %	≥5 %
Cenizas	5 %	7-8 %
Fibra cruda	41.05 %	-
Grasa	2.25 %	6 %
Proteína	8.75 %	20 %

Fuente: Elaboración propia con base en resultados de investigación en comparación con Vivanco, Matute y Campo (2017) y Sangronis, Soto, Valero y Buscema (2014).

La caracterización de la cascarilla de cacao realizada mediante diversos análisis proximales indicó que la muestra de dicha materia prima contiene composición nutricional que trae beneficios a la salud de sus consumidores, tales como lo son el aporte de fibra y minerales. Por este motivo, buscar alternativas de aprovechamiento de este subproducto abre nuevas oportunidades de líneas de producción en la industria alimentaria donde se puedan diversificar las opciones de alimentos con un importante aporte nutricional para la población en general.

4.3 Análisis de la aplicabilidad de la cascarilla de cacao en infusiones

Tomando en cuenta que se tiene la validación del óptimo consumo humano de la materia prima y su caracterización a nivel nutricional, se analizó su aplicabilidad en un producto en específico como lo son las infusiones. Este proceso consistió en el desarrollo de diferentes prototipos y diversos análisis para elegir la mejor alternativa.

4.3.1 Grupo focal preliminar

En el desarrollo de esta metodología se pudo analizar la percepción de seis participantes, quienes probaron los diferentes prototipos propuestos. Como resultados se obtuvieron diferentes apreciaciones

Para la infusión con naranja deshidratada, la mayoría comentó que el color le parecía bastante denso, esto se puede deber a las propiedades cítricas que aporta este elemento. En lo que respecta al olor, este no fue del agrado de los consumidores, algunos comentaron que tenía olor a fruta descompuesta; y en cuanto a sabor, el panel lo determinó como un producto amargo y pesado, por lo que no fue de su gusto.

La infusión que tenía como complemento la canela tuvo un muy buen grado de aceptación. El color era claro, lo cual fue valorado por los consumidores, dado que usualmente las infusiones no suelen tener demasiada turbidez; respecto a su olor, algunos participantes indicaron que si les gustó y para otros no fue del todo de su agrado. No obstante, a la hora de probarlo todos tuvieron una percepción de aprobación a la mezcla.

En el caso del prototipo con hierbabuena, a nivel de olor el panel tuvo opiniones divididas. En cuanto al color, se indicó que era bastante claro, lo cual parece no gustarles; sin embargo, a nivel de sabor a todos les agradó y comentan que sienten notas asiáticas en esta mezcla.

En la infusión con acompañamiento de manzanilla se comentó, respecto a su olor, que es bastante agradable, dulce y fuerte. En color se menciona que es aún más claro que los anteriormente degustados, y en el sabor fue del agrado de todos los panelistas, estos indican que el sabor a cacao se siente más a la hora de probarlo que en su olor, no obstante, no se encontró dentro de los favoritos a la hora de realizar el puntaje final.

El último prototipo probado por los panelistas fue el acompañado por jengibre. En lo que respecta al olor, se indica que se percibe una sensación picosa, en su color se menciona que es bastante turbio y denso. Relacionado a su sabor, los participantes tuvieron diferentes opiniones, para algunos no fue de su agrado y a otros les pareció bastante bien.

Una vez descrito su criterio sensorial respecto a los prototipos, el grupo focal determinó los tres mejores según su percepción. A continuación, se detallan las calificaciones ponderadas obtenidas en el grupo focal desarrollado.

Tabla 21*Resultados de preferencia según grupo focal preliminar*

Prototipo	Calificación ponderada (%)
Cascarilla de cacao + hierbabuena	66.67
Cascarilla de cacao + canela	77.78
Cascarilla de cacao + naranja	11.11
Cascarilla de cacao + jengibre	22.22
Cascarilla de cacao + manzanilla	0.00

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Las muestras de naranja y manzanilla obtuvieron promedios muy bajos de selección a la hora de ser incluidas en el top 3 de cada uno de los participantes. Los prototipos seleccionados fueron determinados según los resultados conseguidos que indican un mayor grado de aceptación dentro del panel realizado: hierbabuena, canela y jengibre.

4.3.2 Análisis fisicoquímico a prototipos

Una vez determinados los tres prototipos a analizar, se hizo un análisis de cada uno de estos con la intención de determinar algunas de sus características fisicoquímicas tales como: pH, brix y acidez. A continuación, se reportan los promedios de los datos obtenidos con su respectiva desviación estándar.

Tabla 22*Resultados de análisis a prototipos de infusiones*

Prototipo	Brix (°) ± ds	pH ± ds	Acidez (%) ± ds
Cascarilla de cacao + canela	0.01 ±0.0	6.49 ±0.02	0.0683 ±0.05
Cascarilla de cacao + jengibre	0.01 ±0.0	6.44 ±0.02	0.0171 ±0.00
Cascarilla de cacao + hierbabuena	0.01 ±0.0	6.45 ±0.02	0.0181 ±0.00

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

Los resultados reportados fueron comparados con el estudio realizado por Teneda, An-hen y Lemus-Moncada (2017). Es importante mencionar que estos autores llevaron a cabo un análisis a una infusión a base de cascarilla de cacao, pero se utilizaron mezclas diferentes a los prototipos estudiados en este trabajo.

A nivel de brix el resultado obtenido en los tres prototipos fue el mismo 0.01° , con una desviación estándar (ds) de ± 0.0 , es decir, que las tres repeticiones de cada una de las muestras no tuvieron diferencias. En el caso de lo reportado por Teneda, An-hen y Lemus-Moncada (2017), el rango varía de 2.00° a 4.00° , con una ds de ± 0.0 . En el análisis de pH se muestra poca variación entre los datos obtenidos de los diferentes prototipos, donde el promedio más alto fue de 6.49; este pH coincide con el reportado por Teneda, An-hen y Lemus-Moncada (2017), el cual se encuentra en el rango de 6.64 a 7.28. Es decir, que la cascarilla sin duda aporta parte de este resultado a los prototipos con leve acidez a nivel sensorial.

En acidez se obtuvo un promedio bastante bajo en las tres infusiones analizadas. Como se observa en la tabla anterior, Teneda, An-hen y Lemus-Moncada (2017) reportaron un rango de 0.01 a 0.02, no obstante, este dato es gramo de ácido cítrico por gramo de producto. Se pueden encontrar similitudes a nivel general de una baja acidez en las infusiones a base de cascarilla de cacao reportado en ambos estudios.

4.3.3 Panel sensorial

Con el propósito de determinar el nivel de preferencia entre los tres prototipos, se realizó una evaluación sensorial tomando en cuenta 15 panelistas semientrenados. Los resultados obtenidos fueron ponderados y se muestran a continuación.

Tabla 23

Resultados de preferencia en panel sensorial con prototipos elegidos

Prototipo	Calificación ponderada (%)
Cascarilla de cacao + jengibre	66.44
Cascarilla de cacao + canela	73.33
Cascarilla de cacao + hierbabuena	71.11

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Según los datos obtenidos, el prototipo favorito del panel fue la infusión a base de cascarilla de cacao y canela, la cual obtuvo un resultado del 73.33 %, algunos de ellos dentro del espacio de comentarios indicaron que su elección se debía particularmente al aroma de esta mezcla. En segundo lugar, se encuentra la infusión a base de cascarilla de cacao y hierbabuena con un 71.11 %, de igual manera algunos de los evaluadores describen este prototipo con un aroma fresco y de su agrado. Por último, se encuentra el prototipo de cascarilla de cacao con jengibre, la cual obtuvo un 66.44 % de los resultados. La varianza de los resultados obtenidos fue de un 21.40 % los resultados crudos se encuentran detallados en el apéndice 7.5, con lo cual se concluye que hubo una diferencia significativa de preferencia a la hora de la selección del prototipo que obtuvo más puntaje en el panel.

Con los resultados obtenidos a lo largo de las diferentes actividades desarrolladas, se determinó que el subproducto de cascarilla de cacao cuenta con alto potencial para su aplicabilidad en infusiones según las apreciaciones sensoriales. También, se concluye que el prototipo con un mayor grado de preferencia es la infusión a base de cascarilla de cacao y canela, mezcla que aporta características llamativas en cuanto a sabor y olor, además de tener una ligera acidez producto de la composición de la cascarilla.

4.4 Validación de la aplicación

Una vez definido el prototipo final para el aprovechamiento del subproducto de cascarilla de cacao, se llevó a cabo un análisis de su aplicabilidad tomando en

cuenta tanto percepciones de posibles consumidores como el aporte antioxidante que puede ofrecer la matriz seleccionada.

4.4.1 Encuesta a potenciales consumidores

En la encuesta, se obtuvo como resultado un total de 380 formularios completados, la mayor participación la tuvieron las mujeres con un 61.6 % de la muestra. Según los datos analizados, el 50.5 % de la muestra se encuentra en un rango de edad de 18 a 35 años, el 47.6 % está dentro del rango de los 35-65 y el restante 1.8 % tiene más de 65 años.

A la hora de consultarles a los potenciales consumidores sobre si han consumido anteriormente infusiones, se tuvo una respuesta positiva, ya que un 95.5 % las han probado y apenas un 5.5 % no lo han hecho. La frecuencia de consumo de este producto es “A veces” con un 41.1 %, seguido de un 22.9 % cuya respuesta fue “Frecuentemente”. Un 19.5 % reportó consumirlo “Casi nunca”, un 14.2 % “Muy frecuentemente” y un 2.4 % “Nunca”, esta información se puede visualizar gráficamente en el apéndice 7.9, figura 22. Según los datos obtenidos, la mayoría de la población encuestada suele tomarlo en cuenta dentro de sus opciones de consumo de bebida caliente.

Las personas encuestadas reportan diferentes aspectos que les gustan de las infusiones, dentro de los principales se encuentran los beneficios que le aportan a la salud gracias a su composición, haciendo énfasis en que son productos naturales, livianos a la hora de su consumo y existe una gran variedad de mezclas que se hallan actualmente en el mercado. El siguiente aspecto expuesto por los participantes fue la practicidad de su consumo, es decir, es de fácil preparación y son fáciles de conseguir en el mercado. El último aspecto mencionado es la percepción organoléptica hacia el producto, ya que suelen tener buen olor, sabor y textura, lo que hace que lo vean como una agradable opción de consumo.

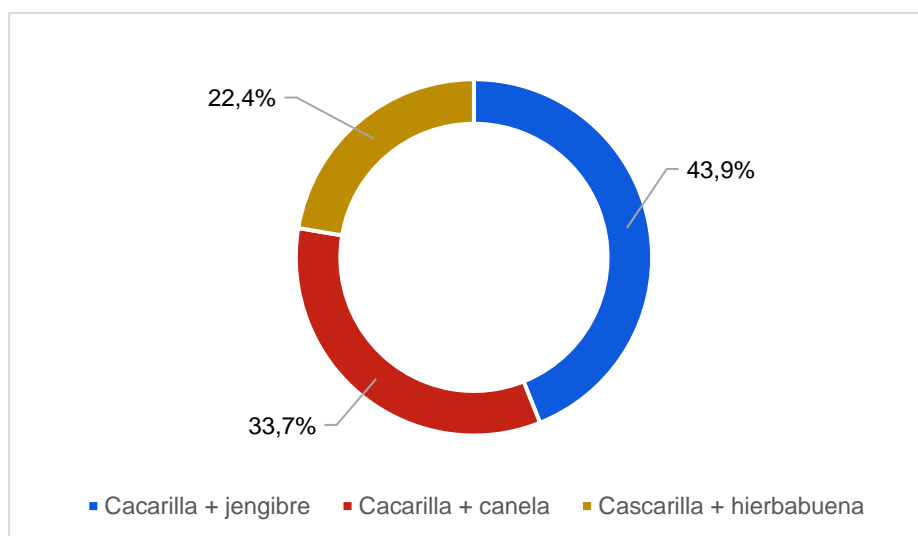
Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la siguiente pregunta, en la cual se consultó sobre las tres características más importantes que toman en cuenta a la hora de adquirir una infusión, las opciones más seleccionadas por los

encuestados fueron “Salud, bienestar y alivio”, seguido por “Sabor, olor y color” y, por último, “Calidad”. Estos datos reflejan las principales variables que se deberán tomar en cuenta a la hora de considerar una línea de producción que se enfoque en el aprovechamiento de la cascarilla de cacao en infusiones.

En cuanto a la consulta sobre qué opinan acerca de una infusión que contenga dentro de su formulación cascarilla de cacao, un 93.4 % de los encuestados afirmaron que es interesante, mientras que a un 6.6 % no le interesa. De esta manera, se evidencia que existe un interés de consumo dentro del mercado emergente. Sobre la preferencia de posibles mezclas a probar, se obtuvieron los siguientes resultados:

Figura 8

Resultados de encuesta, ¿cuál mezcla de infusión se le hace más interesante de probar?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

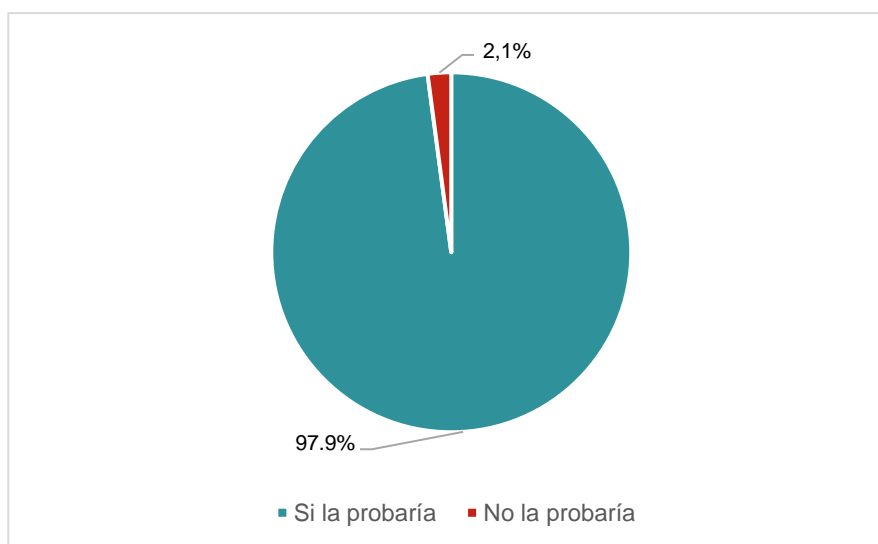
Como se observa en la figura anterior, el mayor porcentaje de los encuestados se inclinó por el prototipo de cascarilla de cacao y jengibre, con un 43.9 %, seguido de un 33.7 % para quienes eligieron la opción de cascarilla de cacao y canela; por último, la opción de cascarilla de cacao y hierbabuena está representada con un 22.4 %. De este resultado se concluye que no siempre lo que parece más

interesante para la población es lo aprobado a nivel organoléptico, esto se debe a que en el análisis sensorial esta mezcla no fue la favorita de los panelistas, por el contrario, la infusión seleccionada fue la que obtuvo el segundo mayor porcentaje de interés.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos de la última pregunta, relacionada con si probarían una infusión que dentro de sus componentes contenga cascarilla de cacao y por ende propiedades antioxidantes. Al respecto, el 97.9 % aseguró que sí la probaría y solo el 2.1 % dio a conocer que no lo haría. Los datos obtenidos reflejan una percepción positiva de los encuestados hacia este uso propuesto del subproducto cascarilla de cacao.

Figura 9

Resultados encuesta, ¿probaría usted una infusión que dentro de sus ingredientes cuente con cascarilla de cacao, sabiendo que tiene función antioxidante?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Los resultados respaldan que la producción de infusiones a base de cascarilla de cacao con el fin de dar un aprovechamiento a este subproducto es una oportunidad para la industria de alimentos, debido al interés mostrado por parte de los potenciales consumidores participantes de la encuesta, además, de surgir un precedente sobre las variables que se deben validar a la hora de escalar la

producción de un subproducto con el que la población no se encuentra familiarizada pero tiene la noción de su valor nutricional debido a que el fruto de cacao es muy reconocido por sus buenos aportes a la salud a nivel mundial.

4.4.2 Grupo focal final

En el desarrollo de esta actividad se buscó analizar la percepción de los potenciales consumidores a la hora de degustar el prototipo de infusión seleccionado a base de cascarilla de cacao y canela. Como se esperaba, en los dos foros realizados se obtuvieron diferentes perspectivas acerca del producto propuesto como alternativa. A nivel de sabor, en el grupo focal 1 final los panelistas opinaron que era dulce y ligero, además uno comentó sentir un sabor residual a cacao luego de probar la infusión. En el caso del grupo focal 2 final, se comentó que sentían poco sabor a cacao. Ambos compartieron opiniones de que les gustaba el sabor de la mezcla y que les agradaría que fuera más fuerte el sabor a canela.

En cuanto al olor, existieron percepciones diferentes en todos los panelistas en cuanto a características específicas, en el grupo focal 1 final uno de ellos mencionó un leve aroma maderoso, otro comenta sentirlo dulce. En el grupo focal 2 final, algunos mencionan que huele mucho a canela y otro de los participantes del foro comenta que percibe el olor a mezcla de cacao y canela. Ambos grupos concuerdan con que les agrada dicha característica sensorial del prototipo propuesto.

Otra de las características sensoriales que evaluaron fue el color. Esta obtuvo respuestas muy variables, algunos comentan que les parece muy transparente, otros que no lo es. Además, en el grupo focal 1 final se comentó ver la infusión limpia sin sedimentos y en el grupo focal 2 final hubo división de opiniones, dado que unos panelistas comentaron verlo limpio y sin sedimento y otros uniforme.

Como aporte final, comentaron su impresión del prototipo seleccionado, cuya respuesta fue positiva puesto que toda la muestra señaló que les había gustado y que lo comprarían. También, mencionaron que podría tener potenciales

consumidores dentro del mercado, lo cual respalda la viabilidad de ramificar la industria cacaotera a un nuevo uso. A continuación, se observan las tablas de las calificaciones obtenidas y sus respectivos ponderados.

Tabla 24

Resultados de la evaluación del foro 1 sobre la infusión de cascarilla de cacao y canela mediante grupo focal

Integrante	Calificación ponderada (%)
1	80
2	90
3	90
4	95
5	80
6	88

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Tabla 25

Resultados de la evaluación del foro 2 sobre la infusión de cascarilla de cacao y canela mediante grupo focal

Integrante	Calificación ponderada (%)
1	80
2	85
3	70
4	70
5	70
6	90

Fuente: Elaboración propia, 2023.

El promedio obtenido en el primer grupo focal final fue de 87.17 % y en el segundo se reportó un 77.50 %. Esto evidencia que el primer foro percibió una

mejor impresión sobre el prototipo propuesto, y en la segunda, aunque todos expresaron su agrado, a la hora de dar la calificación no ofrecieron un alto puntaje.

Según este ejercicio, se determina que a la mayoría de los potenciales consumidores le agrada a nivel organoléptico el prototipo seleccionado. Además, se recibieron buenas críticas constructivas que podrán considerarse a la hora de abrir una nueva línea de producción dentro de la industria cacaotera.

4.4.3 Análisis de contenido antioxidante

Para validar el contenido antioxidante del prototipo seleccionado se llevó a cabo un análisis para determinar el valor comprendido en la muestra. Al respecto se obtuvo como resultado la confirmación de la presencia de esta propiedad funcional con un valor de 684 $\mu\text{mol/L}$ y una desviación estándar de ± 66 , es decir que esta infusión a base de cascarilla de cacao y canela es fuente de antioxidantes, los cuales son respaldados científicamente por el gran aporte de beneficios al cuerpo humano a la hora de consumirlos, convirtiéndose de esta forma en un alimento de alto valor nutricional. Una variable para considerar en los datos obtenidos es la concentración de las diferentes infusiones, por lo que se sugiere aprovechar más el contenido antioxidante que aporta la cascarilla al aumentar la concentración de este producto en la formulación hasta que sensorialmente sea aceptado.

En la validación llevada a cabo mediante los diferentes análisis realizados a la matriz seleccionada del subproducto cascarilla de cacao, se determinó que es una buena alternativa a considerar por la industria alimentaria, con una significativa aceptación por parte de potenciales interesados. Esto debido a que dicha propuesta aporta no solo un gran valor agregado dentro de su composición nutricional como lo es su poder antioxidante, sino también la incorporación de la valorización de residuos para crear un producto final debido a que se aprovecha un subproducto que actualmente no es apreciado dentro de la industria para consumo humano y el cual se encuentra ajustado al enfoque de consumo actual de los individuos.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se resumen las principales conclusiones y recomendaciones según lo analizado en este trabajo final de graduación con base a los hallazgos a nivel fisicoquímico, microbiológico y toxicológico de la cascarilla de cacao muestreada, así como el resultado de diversos análisis cuantitativos y cualitativos para recomendar una propuesta de aplicación de este subproducto en infusiones.

5.1 Conclusiones

Mediante análisis microbiológicos y de toxinas, específicamente aflatoxinas totales, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* se logró verificar la idoneidad del proceso de la cascarilla de cacao. Los resultados obtenidos reflejan que dichos parámetros cumplen con los estándares de la normativa que rige en el país, comprobando que el aprovechamiento de esta materia prima no es una amenaza para el consumo humano en cuanto a estos peligros. Esta conclusión aporta a la industria de bebidas y alimentos una nueva oportunidad de líneas de producción de infusiones a base de este subproducto.

La caracterización de la cascarilla de cacao permitió ofrecer un panorama más claro acerca de la composición nutricional de la muestra analizada. Al compararlo con otros estudios se observó la diversidad existente en los parámetros de grasa, proteína, humedad, cenizas y fibra, dado que el cacao es conocido por su variabilidad según el tipo de producción y condiciones atmosféricas, lo que es una arista que considerar. No obstante, la cascarilla de cacao analizada resultó ser de una muy buena calidad y proyectarse como una materia prima de alto nivel para el consumidor.

La aplicabilidad de la cascarilla de cacao en prototipos de infusiones arrojó resultados alentadores, las diferentes mezclas proyectaron un buen nivel de aceptación. Según los datos obtenidos mediante las diversas técnicas, se estima que la formulación con mayor potencial en el mercado de infusiones es la elaborada a base de cascarilla de cacao y canela, infusión que contiene una acidez y dulzor leve, debido a que su contenido de pH, brix y acidez es muy bajo. Estos resultados señalan que el potencial consumidor prefiere las infusiones con sabores ligeros.

Sin duda, la matriz seleccionada es una alternativa con un alto valor agregado a nivel nutricional ya que se validó la presencia de componentes antioxidantes. Además, se obtuvo una tendencia a la alta aceptación sensorial y de interés de consumo por parte de los participantes, tanto de los diversos grupos focales realizados como de la encuesta aplicada.

Los resultados reflejados a lo largo de esta investigación son un claro llamado de atención para que la industria alimentaria reconsidere su enfoque en el aprovechamiento de los diversos subproductos que día tras día se desperdician y no tienen ningún tratamiento dentro de la gestión que se realiza en las diferentes agroindustrias. Estos sin duda cuentan con un sinfín de beneficios para el consumo humano, tal y como es el caso de la cascarilla de cacao aplicada específicamente en el producto de infusiones. No obstante, es importante recalcar que dadas las diferencias en condiciones de procesamiento la valorización de este subproducto tiene más viabilidad en producciones industrializadas, esto con el fin de poder asegurar que la materia prima proviene de un proceso estandarizado y con los controles pertinentes para asegurar la inocuidad del producto final.

5.2 Recomendaciones

La estandarización de los procesos es la base para asegurar que la calidad de un producto prevalezca a través del tiempo en las diferentes producciones, por lo que se recomienda a los productores de la industria de alimentos y bebidas que pretendan incluir en su línea de productos las infusiones a base de cascarilla de cacao, tomar en cuenta que se deben controlar los procesos previos tales como cosecha, fermentación, secado y tostado, para obtener una materia prima que aporte en su composición nutricional y que no sea un peligro para el consumo humano.

A los productores tanto a nivel industrial como artesanal que deseen darle un aprovechamiento a la cascarilla de cacao en infusiones se les alienta a tener siempre presente la relevancia de realizar análisis de aflatoxinas, dado a que esta micotoxina una vez que se encuentra en la materia prima no existe proceso térmico

que acabe con la misma, representando de esta manera una variable crítica en la valorización del subproducto.

Relacionado al proceso de producción, se conoce que la fermentación es una de las fases que más influye en el resultado final, por lo que se recomienda realizar diversas pruebas para determinar cuál es el proceso que beneficia más al grano de cacao para potencializar su calidad en aporte nutricional de todos los posibles subproductos.

Según los datos obtenidos, los consumidores están interesados no solo en el prototipo ganador, sino en otras posibles mezclas que les agrade tanto a nivel sensorial como en beneficios para la salud. Esto deja abierta la posibilidad de innovar en este campo y diversificar las opciones de infusiones a base de cascarilla de cacao con otras fuentes que aporten las características más buscadas. De esta manera, se ofrece una línea interesante para desarrollar futuras propuestas de prototipos para su lanzamiento al mercado.

A la hora de determinar la formulación de la infusión se recomienda realizar diversos prototipos en los cuales se analice cuál es el máximo valor antioxidante que se puede obtener por parte de la matriz, esto regulando las concentraciones de cascarilla de cacao y que sea aceptable sensorialmente.

Al Programa de Aprovechamiento de Productos y Residuos Agroalimentarios (APRA) se recomienda evaluar la viabilidad técnica del subproducto cascarilla de cacao tanto como materia prima como además la función de la creación de una planta de producción enfocada en este residuo.

Dentro de otras posibles aplicaciones de este subproducto se recomienda la exploración para la obtención especialmente de pectinas, el cual colaboraría en un aprovechamiento para la aplicación en el sector de alimentos.

Para los productores de la industria alimentaria a nivel industrial esta es una línea que aportaría valor agregado a su producción, por lo que se deja como propuesta abierta realizar un aprovechamiento de este subproducto, el cual tiene diversas aristas que facilitarían su comercialización a nivel nacional.

VI. REFERENCIAS

- Almeida, S., Aguilar, T. y Hervert, D. (2014). La fibra y sus beneficios a la salud. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 73-76.
- Andrade Almeida, J., Rivera García, J., Chire Fajardo, G. y Ureña Peralta, M. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao Theobroma cacao L. de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, 1-12. http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-65422019000400001&lng=es&tlng=es
- AOAC International. (1925). *Estado Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 925.19*.
- AOAC International. (1950). *Estados Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 950.48*.
- AOAC International. (1973). *Estados Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 963.15*.
- AOAC International. (1990). *Estado Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 923.03*.
- AOAC Internacional. (1997). *Estados Unidos / Rockville, MD Patente nº AOAC 918.12*.
- AOCS. (2017). *Estados Unidos / Urbana, IL Patente nº AOCS (Ba 6a-05)*.
- Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. (13 de julio de 2010). Ley N°8839 de 2010. Gestión Integral de Residuos. D.O 135. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?nValor1=1&nValor2=68300#ddown
- Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. (13 de octubre de 2010). Ley para la Gestión Integral de Residuos. https://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=68300&nValor3=83024&strTipM=TC
- Banco de Desarrollo para América Latina. (2020). Iniciativa Latinoamericana del Cacao. *Observatorio del cacao fino y de aroma para América Latina (8)*. https://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1530/Iniciativa_Latinoamericana_del%20Cacao_Bolet%C3%ADn_No.%208.pdf?sequence=1
- Blanco-González, A.M. (2021, del 26, 27, 28 y 29 de octubre). *Programa de Aprovechamiento de productos y residuos agroalimentarios como estrategia*

de investigación para la valoración de subproductos en Costa Rica [7º Congreso Internacional de Ingeniería Agroindustrial]. Forum UPB Eco Campus Laureles, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.

Cabrera Rodríguez, E., León Fernández, V., Montano Pérez, A. y Dopico Ramírez, D. (2016). Caracterización de residuos agroindustriales con vistas a su aprovechamiento. *Centro Azúcar*, 43(4), 27-35. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612016000400003&lng=es&tlng=es

Castillo, E., Alvarez, C. y Contreras, Y. (2018). Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (theobroma cacao l.) Cosechados en Caucaagua estado Miranda, Venezuela. *Revista de Investigación*, 42(95), 154-175. <https://www.redalyc.org/journal/3761/376160247008/html/>

CATIE. (2021). *Agronegocios*. CATIE. <http://agronegocios.catie.ac.cr/index.php/eco-productos/cacao/generalidades>

CCA. (2017). *Caracterización y gestión de la pérdida y el desperdicio de alimentos en América del Norte*. Montreal: Comisión para la Cooperación Ambiental. <http://www.cec.org/files/documents/publications/11772-characterization-and-management-food-loss-and-waste-in-north-america-es.pdf>

Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas. (2023). *Informe de venta de servicio*. Centro Nacional de Alta Tecnología.

Chacón Lizano, M. (2019). *Situación actual del cultivo de cacao en Costa Rica*. Oficina Nacional de Semillas, San José. <http://ofinase.go.cr/wp-content/uploads/blog-situacioncacao2019.pdf>

Chinchilla Bravo, N. (26 de junio de 2020). Reducir la pérdida y el desperdicio de alimentos: gran compromiso del TEC. *Hoy en el TEC*. <https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2020/06/26/reducir-perdida-desperdicio-alimentos-gran-compromiso-tec>

Conesa, C. (2019). Aprovechamiento de residuos en la industria hortifrutícola. En C. Conesa, S. López, P. Papasseit, A. Namesny, C. Conesa, S. López, P. Papasseit y A. Namesny (Eds.), *Tecnología Postcosecha - Cítricos y cultivos emergentes en la Comunidad Valenciana* (pp. 187-204). https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/tecnologia_poscosecha__1

- Coto, K. O. (30 de mayo de 2017). Detectan contaminación de granos con micotoxinas que causan cáncer. *Noticias UCR*. <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2017/05/30/detectan-contaminacion-de-granos-con-micotoxinas-que-causan-cancer.html>
- Cury, K., Aguas, Y., Martínez, A., Olivero, R. y Chams, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Colombiana de Ciencia Animal*, 9, 122-132. doi:10.24188/recia.v9.nS.2017.530
- Disco Soup. (2021). *Página principal. Disco Soup*. <http://discosoupe.org/>
- European Food Safety Authority. (2022). *Aflatoxinas en los alimentos*. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/aflatoxins-food>
- FAO. (2012). *Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención*. <http://www.fao.org/3/i2697s/i2697s.pdf>
- FAO. (2015). *Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe*. Boletín 2. https://www.tec.ac.cr/sites/default/files/media/doc/perdidas_y_desperdicios_de_alimenticios_en_america_latina_y_caribe.pdf
- FAO. (2019). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos*. Roma. <http://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf>
- Flores del Valle, W. (7 al 9 de mayo de 2019). *Aprovechamiento del Cacao Tradición y Futuro. Introducción al procesamiento y agregación de valor en cacao* [ponencia]. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, San José, Costa Rica.
- Fountain, A. y Huetz Adams, F. (2020). *Barómetro del cacao*. Fundación Mundial del Cacao. <https://www.voicenetwork.eu/wp-content/uploads/2021/04/2020-Baro%CC%81metro-del-Cacao-ES.pdf>
- García Batista, R. M., Quevedo Guerrero, J. N. y Socorro Castro, A. R. (2020). Prácticas para el aprovechamiento de residuos sólidos en plantaciones bananeras y resultados de su implementación. *Universidad y Sociedad*, 12(1), 280-291. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202020000100280&lng=es&tlng=pt.

- García, G. (7 de septiembre de 2020). *The Food Tech*. <https://thefoodtech.com/nutricion-y-salud/cacao-un-alimento-de-alto-valor-nutricional/>
- Global Foodbanking Network. (2021). *Página principal. Global Foodbanking Network*. <https://www.foodbanking.org/es/que-hacemos/>
- Gómez Pastor, D. (2020). El cacao: condiciones de cultivo, composición y valor nutricional. *Tecnología Alimentaria*. <https://fundacion-antama.org/el-cacao-condiciones-de-cultivo-composicion-y-valor-nutricional/>
- Guanga, S. N. (2018). Estudio y aprovechamiento de los residuos del cacao de la compañía Nestlé como estrategia comercial. [Tesis de Ingeniería en Gestión Empresarial, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/29775/1/TESIS%20FINAL%20SAMANTHA%20GUANGA%20%2825%20FEB%202018%29%20%281%29.pdf>
- IICA, Arvelo Sánchez, M. Á., González León, D., Maroto Arce, S., Delgado López, T. y Montoya López, P. (2017). *Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas*. IICA. <http://www.iica.int>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1986). *NTE INEN 0381: Conservas vegetales. Determinación de acidez titulable. Método potenciométrico de referencia*. INEN.
- John, O., Okunade, S., Opoola, E., Babatunde, A., Ajide, S. y Elaigwu, S. (2019). Exploration of Cocoa (Theobroma cacao) By-Products as Valuable Potential Resources in Livestock Feeds and Feeding Systems. *IntechOpen*, 1-14.
- Leitón, E. U. (2019). *Caracterización de la comercialización internacional del cacao como ingrediente en las industrias cosmética y alimentaria*. PROCOMER. <http://sistemas.procomer.go.cr/DocsSEM/5A52A4C7-2FAF-4D5B-9940-9F36381AEC3B.pdf>
- Makinde, J., Adewale Okunade, S., Babatunde Sikiru, A., Elaigwu, S., Opoola, E. y Ajide, S. (julio de 2019). Exploration of Cocoa (Theobroma cacao) By-Products as Valuable Potential Resources in Livestock Feeds and Feeding Systems. *IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.87871
- Martínez, M. M., Vargas del Río, L. M. y Gómez Quintero, V. M. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, *Biosalud*, 89-109.

- Milwaukee Instruments, Inc. (septiembre de 2020). Instruction Manual. *Milwaukee Instruments*.
https://milwaukeeinstruments.com/content/manuals/MANMA871_09_20.pdf
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). *Plan Nacional de Cacao 2018-2028*. Comisión Interinstitucional del Cacao.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riesgo de Perú. (junio de 2021). Observatorio de Commodities: Cacao. *Boletín trimestral de estadísticas del cacao, XLVII* (2), 1-19. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego.
<https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2009611/Commodities%20Cacao%3A%20ene-mar%202021.pdf>
- Negaresh, S. y Marín, I. (2013). El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados. *Agroforestería en las Américas* (49), 93-98.
<http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6144/12.Negaresh.pdf>
- Norbis, P., Henríquez, M. y Villanueva, S. (2018). *Utilización de los subproductos del cultivo y procesamiento del cacao*. Jornadas de Investigación Encuentro Académico Industrial Facultad de Ingeniería UVC. Caracas, Venezuela.
<http://www.ing.ucv.ve/jifi2018/documentos/ambiente/AIS003.pdf>
- O'neal Coto, K. (30 de enero de 2019). Nueva era del cacao costarricense inicia a dar frutos en la Zona Sur. *Noticias UCR*.
<https://www.ucr.ac.cr/noticias/2019/01/30/nueva-era-del-cacao-costarricense-comienzo-a-dar-frutos-en-la-zona-sur.html>
- ONU. (2021). *Objetivos de desarrollo sostenible*. Organización de Naciones Unidas. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/>
- Pillco Herrera, B. M., Molina Cedeño, C. S., Salazar Muñoz, E. F., Coronel Espinoza, B. D., Sarduy Pereira, L. B. y Diéguez Santana, K. (2020). Producción más limpia como estrategia ambiental preventiva en el proceso de elaboración de pasta de cacao. Un caso en la Amazonia Ecuatoriana. *Revista Industrial Data*, 23(2), 59-72.
doi:<http://dx.doi.org/10.15381/idata.v23i2.17640>
- Polenta, G. (agosto de 2016). Aprovechamiento de subproductos y valorización de recursos autóctonos: interrelación, investigación, producción, desarrollo y sociedad. *CYTED*.

<http://www.cytod.org/sites/default/files/Aprovechamiento%20de%20subproductos%20y%20valorizacion%20%20de%20recursos%20autoctonos-%20interrelacion%20%20investigacion%20-%20produccion%20-%20desarrollo%20y%20sociedad.pdf>

Pon, J. (7 de febrero de 2019). *United Nations Environment Programme Finance*. CEPAL.

https://www.cepal.org/sites/default/files/presentations/gestion_de_residuos_-_jordi_pon.pdf

Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009

Rangel, V. D. (2018). *Valorización de un subproducto del procesamiento agroindustrial de guayaba (psidium guajava) mediante la extracción de compuestos antioxidantes*. [Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos, Universidad de Costa Rica]. San José, Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/5980/1/43318.pdf>

Rodríguez López, S. G. y Vargas Barrantes, Y.M. (2022). Evaluación de la viabilidad técnica del aprovechamiento de la cascarilla de cacao (*teobroma cacao*) en la elaboración de productos alimentarios (Licenciatura Ingeniería en Tecnología de Alimentos). Universidad Técnica Nacional.

Rojas González, A. F., Flórez Montes, C. y López Rodríguez, D. F. (2019). Prospectivas de aprovechamiento de algunos residuos agroindustriales. *Cubana de Química*, 31(1), 31-52. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212019000100031&lng=es&tlng=en

Rojas Rojas, K., Hernández-Aguirre, C. y Mencía-Guevara, A. (2021). Transformaciones bioquímicas del cacao (*Theobroma cacao* L.) durante un proceso de fermentación controlada. *Agronomía Costarricense*, 45(1), 53-65. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242021000100053&lng=en&tlng=es

Romer Labs Division Holding GmbH. (2011). *Romer Labs*. https://www.romerlabs.com/shop/inter_es/agraquant-r-total-aflatoxin-elisa-test/#theme.catalog.product.description.properties

- Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, V. y Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(2), 123-130. <http://ve.scielo.org/pdf/alan/v64n2/art07.pdf>
- Siedentopp Ahnatalstraße, U. (2009). El cacao, planta medicinal y de deleite. *Revista Internacional de Acupuntura*, 3(4), 197-200. doi:10.1016/S1887-8369(09)73160-6
- SupliLab S. A. (2021). *Determinación de Presencia o ausencia de Salmonella spp mediante método VIDAS®-Easy SLM*. SupliLab, S. A.
- SupliLab S. A. (2022). *Informe de resultados*. SupliLab, S. A.
- SupliLab S. A. (2021). *Recuento de coliformes y E coli mediante técnica de Petrifilm®*. SupliLab, S. A.
- Tapia, C. (2015). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) variedad arriba y CCN51 para la elaboración de una infusión*. [Tesis de Ingeniería de Alimentos, Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11981/1/AL%20574.pdf>
- Teneda, W., An-hen, K. y Lemus-Moncada, R. (2017). Caracterización de una infusión de cascarilla de cacao (Theobroma cacao L., var. Arriba) con hierbas aromáticas. *Agro Sur*, 47-55.
- Teneda Llerena, W., Guamán Guevara, M. D. y Oayque Mora, S. (2019). Exploración de la intención de consumo de la Cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) como infusión: caso Tungurahua-Ecuador. *Cuadernos de Contabilidad*, 20(50). doi:
<https://doi.org/10.11144/Javeriana.cc20-50.eicc>
- Vázquez Ovando, A., Ovando Medina, I., Adriano Anaya, L., Betancur Ancona, D. y Salvador Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 239-254.
<https://www.alanrevista.org/ediciones/2016/3/art-10/>
- Vera Chang, J., Vallejo Torres, C., Párraga Moran, D., Morales Rodríguez, W., Macías Véliz, J. y Ramos Remache, R. (2014). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (Theobroma cacao L.) en el Ecuador. *Revista Ciencia y Tecnología*, 7(2), 21-34. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5090269>

- Villamizar Jaimes, A. R. y López Giraldo, L. J. (2017). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Respuestas*, 22(1), 75-83.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5848296>
- Vivanco Carpio, E., Matute Castro, L. y Campos Fernández, M. (2018). Caracterización fisicoquímica de la cascarilla de Theobroma cacao L, variedades Nacional y CCN-51. *Conference Proceedings UTMACH*, 2(1), 213-222.
<https://investigacion.utmachala.edu.ec/proceedings/index.php/utmach/articloe/view/309>
- Wilson, D., Rodric, L., Modak, P., Soos, R., Carpintero, A., Velis, C. y Simonett, O. (2016). *Perspectiva mundial de la gestión de residuos*. United Nations Environment Programme Finance.
<http://www.unep.org/ietc/OurWork/WasteManagement/GWMO>

VII. APÉNDICES

7.1 Resultados de análisis proximales desarrollados a cascarilla de cacao, objetivo específico 2

A continuación, se detallan los datos crudos de los análisis proximales realizados en la cascarilla de cacao.

Tabla 26

Resultados de análisis de humedad en muestra compuesta de cascarilla de cacao

Muestra	Cápsula (g)	Cápsula + muestra inicial (g)	Cápsula + muestra final (g)	Humedad (%)
1	9.3232	11.3480	11.1733	8.6280
2	9.4045	11.4882	11.2938	9.3296
3	10.1286	12.2109	12.0033	9.9697

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

Tabla 27

Resultados de análisis de cenizas en muestra compuesta de cascarilla de cacao

Muestra	Peso crisol	Peso crisol + muestra	Peso crisol + muestra final	Cenizas (%)
1	25.6919	28.7014	25.9650	9.0746
2	26.1482	29.3073	26.4489	9.5185
3	22.4092	25.4262	22.6744	8.7902

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

Tabla 28

Resultados de análisis de proteína en muestra compuesta de cascarilla de cacao

Muestra	Peso de muestra (mg)	Volumen gastado HCl (mL)	Proteína (%)
1	570.0000	5.5000	16.2413

2	692.4000	7.1000	17.2597
3	686.4000	7.1000	17.4106

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

Tabla 29

Resultados de análisis de grasa en muestra compuesta de cascarilla de cacao

Muestra	Beaker + núcleo de ebullición (g)	Muestra inicial (g)	Beaker + núcleo de ebullición + muestra final (g)	Grasa (%)
1	76.6980	3.8550	77.1858	12.6537
2	76.0881	3.8326	76.5459	11.9449
3	74.0627	3.8185	74.4175	9.29161

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

Tabla 30

Resultados de análisis de fibra cruda en muestra compuesta de cascarilla de cacao

Muestra	Filtro (g)	Muestra (g)	Resultado muestra (g)	Fibra cruda (%)
1	0.5386	0.9812	0.8468	31.4105
2	0.5381	0.9684	0.8677	34.0355
3	0.5592	0.9992	0.8668	30.7846

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

7.2 Desarrollo de metodología “Determinación de proteína mediante método Kjeldahl, referencia AOAC 950.48”

Figura 10

Proceso de inicio de digestión en muestra de cascarilla de cacao



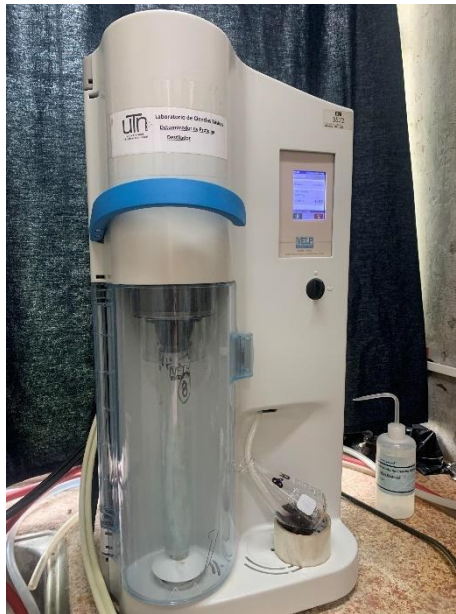
Figura 11

Resultado del proceso acabado de digestión en muestra de cascarilla de cacao



Figura 12

Destilador para proceso de determinación de proteína

**Figura 13**

Resultados de titulación con HCl para determinación de proteína



7.3 Transcripción grupo focal preliminar, objetivo específico 3

Moderador: las instrucciones para llevar a cabo este grupo focal se basan en que daré a probar un total de cuatro diferentes prototipos de infusiones; guiaré las

preguntas hacia ustedes para que me comenten cuáles son sus percepciones a nivel organoléptico (sabor, color y olor) de cada una de estas.

Iniciaremos con la infusión con naranja:

- ¿Qué les parece el color?

- Denso
- Color parecido a un té de melocotón

- ¿Qué les pareció el olor?

- Bastante mal
- A fruta podrida
- La primera impresión fue mala, pero luego se asimila el olor, seguro uno se acostumbra.

- ¿Qué les pareció el sabor?

- Muy ralo, insípido
- Tal vez con azúcar
- Muy dominante el sabor a cacao
- Amargo
- Inicia insípido, pero al final se vuelve pesado

A continuación, probaremos la infusión con canela:

- ¿Qué les parece el olor?

- Como a arroz con leche
- Dulce
- A canela

- ¿Qué les parece el color?

- Un poco más claro que el de naranja

- ¿Qué les parece el sabor?

- Muy bien
- Sorprendentemente bien
- Menos amargo que el anterior

La siguiente infusión que degustaremos será la que contiene hierbabuena:

- ¿Qué les parece el color?

- Más clara que las dos anteriores

- ¿Qué les parece el olor?
 - Horrible
 - A mí me gusta el olor
 - Lo siento fresco
 - Lo asocio con un enjuague bucal

- ¿Qué les parece el sabor?
 - Aplaca el amargo
 - Yo lo compraría, me gusta
 - Está muy bien, sabe muy rico
 - Tiene notas de sabores asiáticos

A continuación, probaremos la infusión con manzanilla:

- ¿Qué les parece el olor?
 - Feo
 - Se siente el cacao más fuerte que en las anteriores
 - Chocolatoso
 - Dulce

- ¿Qué les parece el color?
 - Más claro que los anteriores
 - Más amarillo, no tan fuerte como los anteriores

- ¿Qué les parece el sabor?
 - Se siente mucho el cacao
 - Sabe más de lo que huele la mezcla de cacao y manzanilla

La última infusión es con jengibre:

- ¿Qué les parece el olor?
 - Olor a jengibre muy leve
 - Un poco picoso
- ¿Qué les parece el color?
 - Ámbar
 - Denso
 - Rojizo
 - Turbio

- ¿Qué les parece el sabor?
- Con limón sabría muy rico
 - Me gusta
 - No me gustó el sabor

Ahora van a calificar del 1 al 3 cada prototipo, siendo el 3 el que más les gustó:

Tabla 31

Preferencia de infusiones en grupo focal preliminar realizado a potenciales consumidores de infusiones

Integrante / Escala	3	2	1
Integrante 1	Hierbabuena	Canela	Jengibre
Integrante 2	Hierbabuena	Canela	Naranja
Integrante 3	Hierbabuena	Canela	Naranja
Integrante 4	Canela	Hierbabuena	Jengibre
Integrante 5	Hierbabuena	Canela	Jengibre
Integrante 6	Canela	Hierbabuena	Jengibre

Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.4 Cuestionario aplicado en panel sensorial

NOMBRE _____

FECHA _____

NOMBRE DEL PRODUCTO _____

Frente a usted hay 3 muestras de infusiones, que debe de ordenar en forma creciente de acuerdo con su preferencia tomando en cuenta los parámetros organolépticos de sabor, color y olor.

Cada muestra debe de llevar un orden diferente, dos muestras no deben de tener el mismo orden.

MUESTRA	
1	
2	
3	

COMENTARIOS

¡MUCHAS GRACIAS!

7.5 Resultados obtenidos en panel sensorial

Tabla 32

Resultados de panel sensorial a prototipos de infusiones

Participante	1	2	3	Comentarios
1	831	739	425	Me gustó el olor a canela, el 425 me pareció más amargo.
2	425	739	831	
3	425	739	831	Me encantó el aroma de la 739.
4	425	739	831	

5	425	739	831
6	425	739	831
7	739	425	831
8	739	425	831
9	425	831	739
10	425	831	739
11	425	831	739
12	831	425	739
13	831	425	739
14	831	739	425
15	831	739	425

Fuente: Elaboración propia, 2022

Donde la numeración corresponde a los siguientes prototipos:

831: cascarilla de cacao y hierba buena.

739: cascarilla de cacao y canela.

425: cascarilla de cacao y jengibre.

7.6 Resultados de análisis proximales desarrollados a prototipos de infusiones, objetivo específico 3

A continuación, se detallan los datos crudos de los análisis proximales realizados en los diferentes prototipos de infusiones.

Tabla 33

Resultados de análisis de pH en muestras de prototipos de infusiones

Muestra	Repetición		
	1	2	3
Canela	6.48	6.48	6.51
Jengibre	6.42	6.44	6.45
Hierbabuena	6.42	6.46	6.46

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

Tabla 34

Resultados de análisis de brix en muestras de prototipos de infusiones expresado en °brix

Muestra	Repetición		
	1	2	3
Canela	0.1	0.1	0.1
Jengibre	0.1	0.1	0.1
Hierbabuena	0.1	0.1	0.1

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

Tabla 35

Resultados de análisis de acidez titulable en muestras de prototipos de infusiones expresado en porcentaje de acidez

Muestra	Repetición		
	1	2	3
Canela	0.0960	0.0960	0.0128
Jengibre	0.0160	0.0192	0.0160
Hierbabuena	0.0160	0.0224	0.0160

Fuente: Elaboración propia en laboratorios de la Universidad Técnica Nacional, 2022.

7.7 Muestras de turbidez en los diferentes prototipos de infusiones

Figura 14

Turbidez de prototipos de infusiones a base de cascarilla de cacao



7.8 Resultados visuales del desarrollo de la metodología “Determinación de acidez titulable mediante método potenciométrico”

Figura 15

Diferencia visual de color en muestra sin titular y titulada para determinación de acidez



Figura 16

Repetición de muestra de prototipo de infusión cascarilla de cacao y canela titulada en análisis de acidez

**Figura 17**

Repetición de muestra de prototipo de infusión cascarilla de cacao y jengibre titulada en análisis de acidez



Figura 18

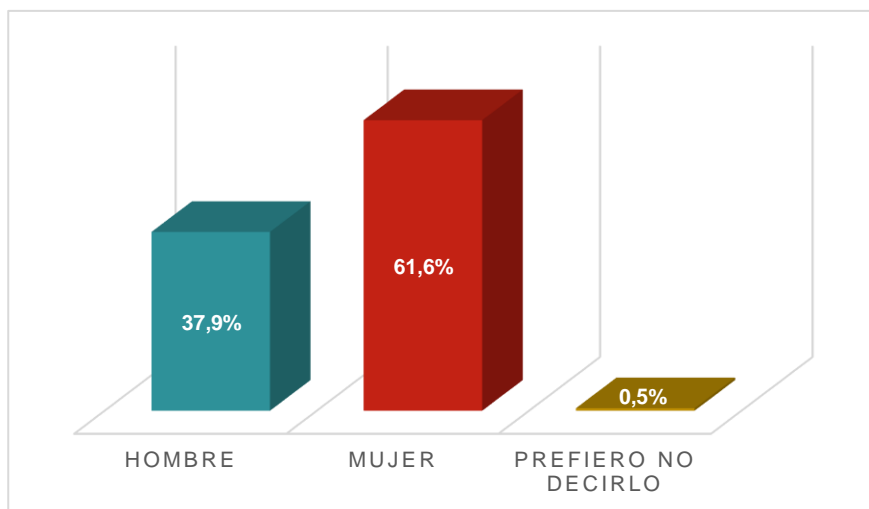
Repetición de muestra de prototipo de infusión cascarilla de cacao y hierba buena titulada en análisis de acidez



7.9 Resultados de encuesta, objetivo específico 4

Figura 19

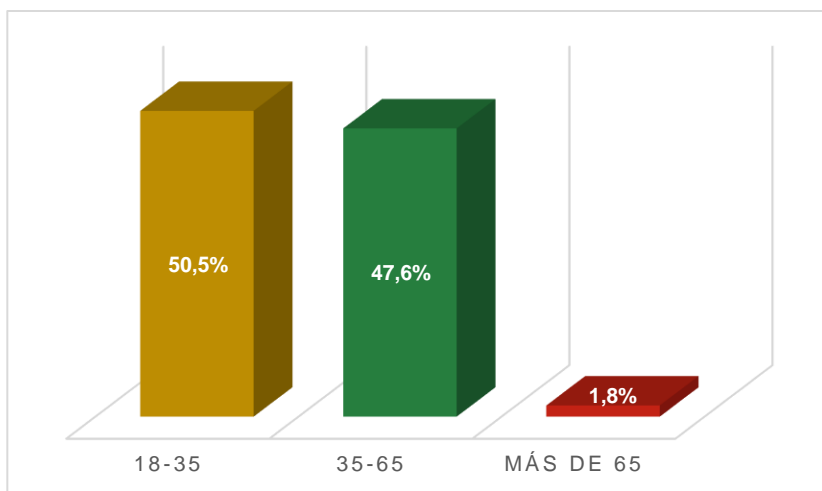
Resultados encuesta, ¿cuál es su sexo?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 20

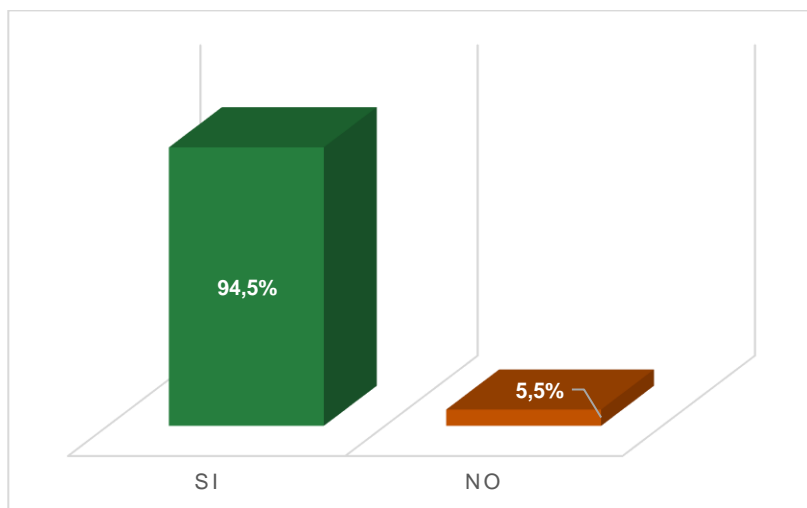
Resultados encuesta, ¿en qué rango de edad se encuentra usted?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 21

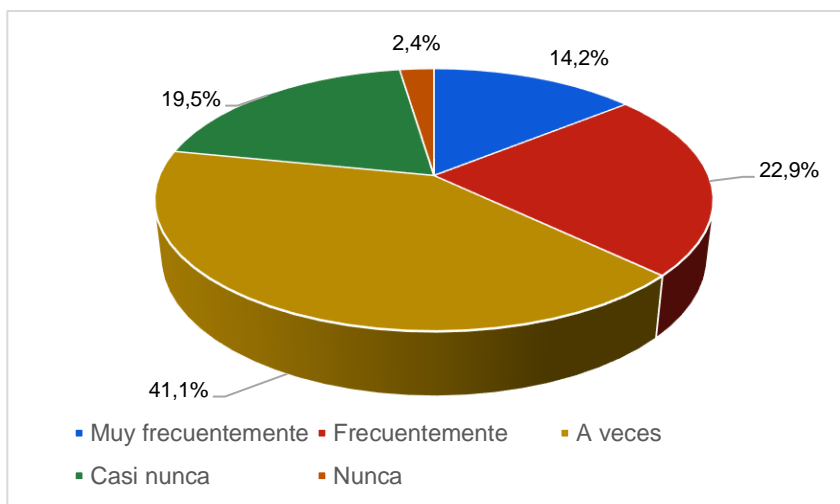
Resultados encuesta, ¿ha consumido anteriormente infusiones?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 22

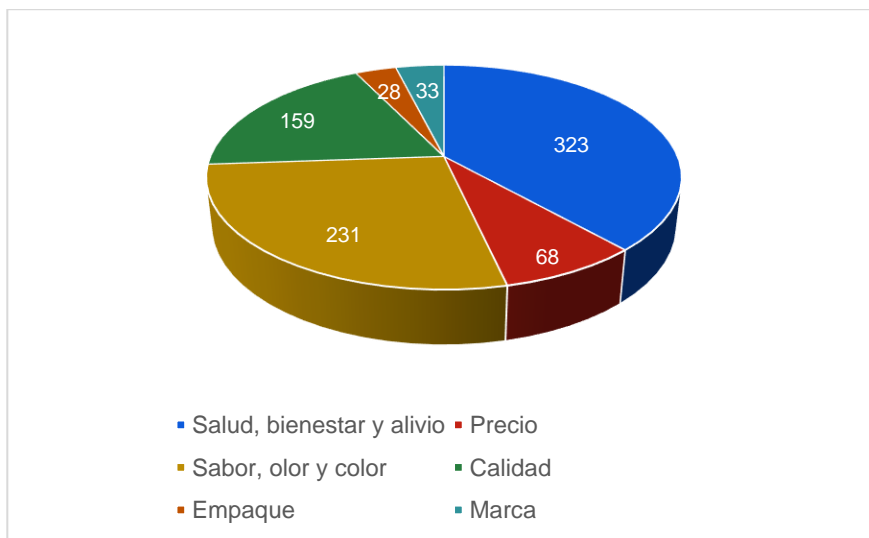
Resultados encuesta, ¿con qué frecuencia consume usted infusiones?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 23

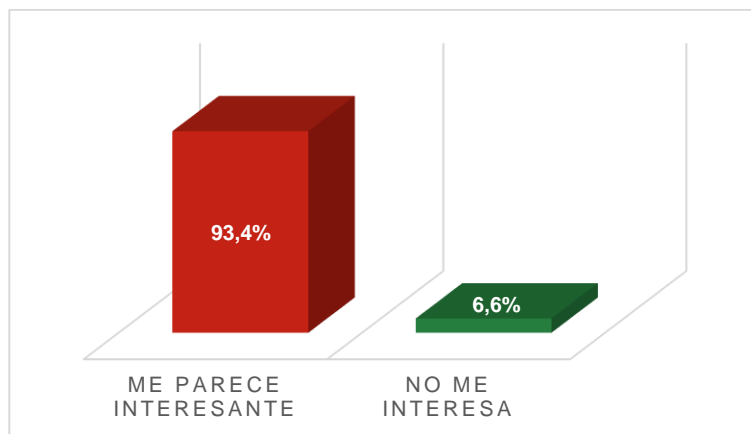
Resultados encuesta, ¿cuáles son las tres características más importantes que usted toma en cuenta a la hora de adquirir infusiones?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 24

Resultados encuesta, ¿qué opina usted sobre una infusión que dentro de sus ingredientes contiene cascarilla de cacao?



Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.10 Transcripción grupo focal 1 final, objetivo específico 4

Moderador: las instrucciones para llevar a cabo este grupo focal se basan en que daré a probar un prototipo de infusión a base de cascarilla de cacao y canela; guiaré las preguntas hacia ustedes para que me comenten cuáles son sus percepciones a nivel organoléptico (sabor, color y olor) de cada una de estas.

- ¿Qué les pareció el olor?
 - Dulce
 - Apetitoso
 - Vainilloso
 - Huele rico, ligero
 - Huele bien, maderoso
- ¿Qué les parece el color?
 - Podría ser más oscuro
 - Me gusta, no es transparente
 - Se ve limpio, sin sedimento
 - Un poco transparente
- ¿Qué les parece el sabor?
 - Sabe más a canela

- Esta rico, ligero
- Se ve más espeso, pero cuando se prueba esta ligero
- Dulce
- Del cacao lo que siento es el sabor residual que deja en la boca, pero la primera impresión en el paladar es de canela

- Impresiones finales:

- Me gustó
- Creo que las personas lo consumirían

Ahora van a calificar del 1 al 10 el prototipo, siendo el 10 el mayor puntaje.

Tabla 36

Evaluación grupo focal 1 realizado a potenciales consumidores de infusiones en prototipo final

Panelista	Calificación
1	8
2	9
3	9
4	9.5
5	8
6	8.8

Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.11 Transcripción grupo focal 2 final, objetivo específico 4

Moderador: las instrucciones para llevar a cabo este grupo focal se basan en que daré a probar un prototipo de infusión a base de cascarilla de cacao y canela; guiaré las preguntas hacia ustedes para que me comenten cuáles son sus percepciones a nivel organoléptico (sabor, color y olor) de cada una de estas.

- ¿Qué les parece el olor?

- Fuerte
- Huele a canela
- Me huele a canela y cacao

- Siento olor de los dos
 - Siento muy suave el olor a canela
- ¿Qué les parece el color?
- Uniforme
 - Un poco de sedimento
- ¿Qué les parece el sabor?
- Me gusta
 - Me sabe poco a canela
 - Yo lo tomaría
 - Me sabe poco a cacao
- Impresiones finales
- Me gustó
 - Tiene un aroma muy rico, lo consumiría

Ahora van a calificar del 1 al 10 el prototipo, siendo el 10 el mayor puntaje.

Tabla 37

Evaluación grupo focal 2 realizado a potenciales consumidores de infusiones en prototipo final

Panelista	Calificación
1	8
2	8.5
3	7
4	7
5	7
6	9

Fuente: Elaboración propia, 2023.

VIII. ANEXOS

8.1 Datos crudos reportados por laboratorio externo en análisis de *Salmonella spp*, *Escherichia coli* y aflatoxinas

Figura 25

Tabla de resultados de análisis microbiológicos y de aflatoxinas reportados por laboratorio externo

ANÁLISIS					
Código Ensayo	Ensayo	Metodo	Resultado ²		Valor Referencia ³
ME-64	<i>Salmonella spp</i> *	VIDAS-Easy SLM de la casa Biomerieux	Ausencia	/ 25 g	N/A
ME-27	<i>Escherichia coli</i> *	AOAC 991.14, AOAC 998.08, AOAC 986.33, AOAC 989.10.	< 10	UFC / g	N/A
ME-14	Aflatoxinas totales**	ELISA	< 5	ppb	N/A

Fuente: SupliLab S. A. (2022).

8.2 Ejemplo proceso de determinación de presencia de colonias típicas *Salmonella spp*. en diferentes tipos de agares

Figura 26

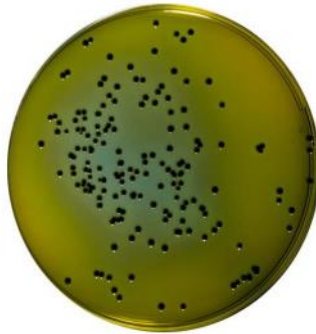
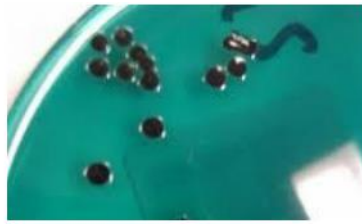
Resultado de morfología colonial de *Salmonella spp*. en medio agar XLD



Fuente: SupliLab S. A. (2021).

Figura 27

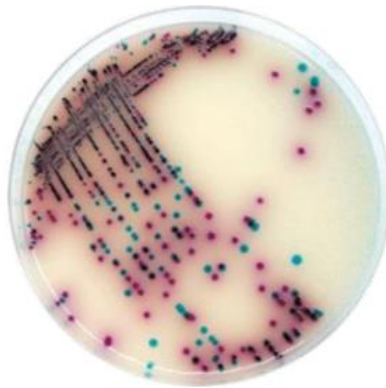
Resultado de morfología colonial de *Salmonella spp.* en medio agar Hecktoen



Fuente: SupliLab S. A. (2021).

Figura 28

Resultado de morfología colonial de *Salmonella spp.* en medio agar cromogénico ASAP



Fuente: SupliLab S. A. (2021).

8.3 Identificación bioquímica de *Salmonella spp.* mediante el método de inoculación TSI y LIA

Figura 29

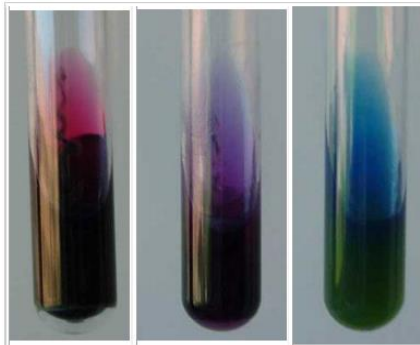
Proceso de inoculación de *Salmonella spp* mediante el método de inoculación TSI y LIA



Fuente: SupliLab S. A. (2021).

Figura 30

Ejemplos de resultados en reacciones de TSI, LIA y citrato en cepas de *Salmonella spp*

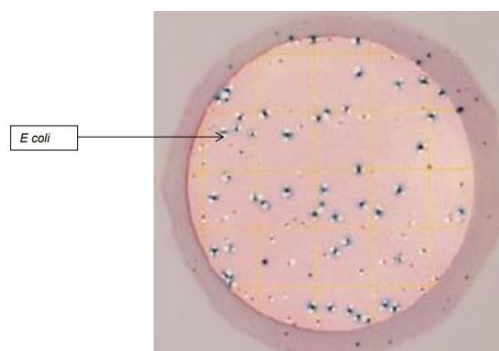


Fuente: SupliLab S. A. (2021).

8.4 Ejemplo de morfología colonial de *Escherichia coli* en petrifilm

Figura 31

Morfología colonial de *E.coli* en petrifilm



Fuente: SupliLab S. A. (2021).

8.5 Resultados de análisis proximales reportados por otros autores, objetivo específico 2

A continuación, se detallan los datos crudos reportados por otros autores que llevaron a cabo análisis proximales a cascarilla de cacao.

Tabla 38

Resultados de análisis proximales realizados a cascarilla de cacao por otros autores (g/100g)

Muestra	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza
I	4.45 ± 0.46	19.69 ± 0.53	1.38 ± 0.55	8.09 ± 0.04
II	4.83 ± 0.35	18.54 ± 0.45	1.12 ± 0.33	7.52 ± 0.12
III	3.46 ± 0.37	18.72 ± 0.39	1.33 ± 0.41	7.51 ± 0.46
IV	3.68 ± 0.63	19.07 ± 0.53	1.27 ± 0.21	7.87 ± 0.09
V	5.08 ± 0.23	18.54 ± 0.69	1.09 ± 0.48	8.04 ± 0.05

Fuente: Adaptado de Sangronis, Soto, Valero y Buscema (2014).

Tabla 39

Resultados de análisis proximales realizados a cascarilla de cacao por otros autores (%)

Parámetros	Nacional Media / DS	CCN-51 Media /DS
Humedad	8.74 / 0.05	6.43 / 0.05
Cenizas	5.14 / 0.12	5.54 / 0.11
Fibra	41.96 / 0.85	40.14 / 0.23
Grasa	2.25 / 0.18	1.56 / 0.27
Proteína	8.75 / 0.49	8.48 / 0.59

Fuente: Adaptado de Vivanco, Matute y Campo (2017).

8.6 Resultados de análisis proximales reportados por otros autores, objetivo específico 3

Tabla 40

Resultados de análisis proximales reportados en infusiones a base de cascarilla de cacao por otros autores

Tratamientos	pH	Acidez	Brix
a ₀ b ₀	6.93 ± 0.06	0.01 ± 0.00	2.00 ± 0.00
a ₀ b ₁	6.64 ± 0.04	0.01 ± 0.00	4.00 ± 0.00
a ₀ b ₂	7.20 ± 0.01	0.01 ± 0.00	3.00 ± 0.00
a ₁ b ₀	7.20 ± 0.02	0.01 ± 0.00	2.00 ± 0.00
a ₁ b ₁	6.59 ± 0.09	0.01 ± 0.00	3.00 ± 0.00
a ₁ b ₂	6.91 ± 0.13	0.01 ± 0.00	2.00 ± 0.00
a ₂ b ₀	7.27 ± 0.06	0.01 ± 0.00	2.00 ± 0.00
a ₂ b ₁	6.83 ± 0.06	0.02 ± 0.00	4.00 ± 0.00
a ₂ b ₂	7.28 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.00 ± 0.00
Testigo	6.85 ± 0.05	0.01 ± 0.00	2.00 ± 0.00

Fuente: Adaptado de Teneda, An-hen y Lemus-Moncada (2017).

8.7 Datos crudos reportados por laboratorio externo en análisis de concentración de equivalentes de trolox en el prototipo de infusión seleccionado

Figura 32

Concentración de equivalentes de trolox en la muestra

Muestra	Equivalentes de trolox ($\mu\text{mol/L}$)
Infusión de cascarilla de cacao y canela	684 \pm 66

Fuente: Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, 2023.

Carta de revisión filológica

Montes de Oca, San José

10 de julio de 2023

Señores

Carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos

Área de Tecnología

Universidad Técnica Nacional

Sede Atenas

A quien corresponda:

Por este medio yo, Luis Diego Chaves Chaves, mayor, casado, Licenciado en Enseñanza del Castellano y la Literatura y Bachiller en Filología Española, incorporado al Colegio de Licenciados y Profesores, con el número de carné 75654, vecino de Montes de Oca, San José, portador de la cédula de identidad 206870979, hago constar:

1. Que he revisado el Trabajo Final de Graduación titulado *Valorización de la cascarilla residual del procesamiento agroindustrial del cacao (*Theobroma cacao* L) para su potencial aplicación en infusiones*.
2. Que el texto inédito es sustentado por Mariam Delgado Trejos, cédula de identidad 1-1658-0582.
3. Que se le han hecho las correcciones pertinentes en acentuación, ortografía, puntuación, concordancia gramatical y otros aspectos del campo filológico.

En espera de que mi participación satisfaga los requerimientos de la unidad académica correspondiente, se despide atentamente



Lic. Luis Diego Chaves Chaves

Carné No. 75654

**CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA USO Y MANEJO DE LOS TRABAJOS FINALES DE
GRADUACIÓN
UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL**

Atenas, 23 de agosto del 2023.

Señores

Vicerrectoría de Investigación

Sistema Integrado de Bibliotecas y Recursos Digitales

Estimados señores:

Yo Mariam Delgado Trejos portadora de la cédula de identidad número 1-1658-0582. En mi calidad de autora del trabajo de graduación titulado: VALORIZACIÓN DE LA CASCARILLA RESIDUAL DEL PROCESAMIENTO AGROINDUSTRIAL DEL CACAO (*THEOBROMA CACAO L*) PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN INFUSIONES.

El cual se presenta bajo la modalidad de:

Tesis de Graduación

Presentado en la fecha 28/07/2023, autorizo a la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas, para que mi trabajo pueda ser manejado de la siguiente manera:

Autorizo	SI	No
Conservación de ejemplares para préstamo y consulta física en biblioteca	X	
Inclusión en el catálogo digital del SIBIREDI (Cita catalográfica)	X	
Comunicación y divulgación a través del Repositorio Institucional	X	
Resumen (Describe en forma breve el contenido del documento)	X	
Consulta electrónica con texto protegido	X	
Descarga electrónica del documento en texto completo protegido	X	
Inclusión en bases de datos y sitios web que se encuentren en convenio con la Universidad Técnica Nacional contando con las mismas condiciones y limitaciones aquí establecidas.	X	

Por otra parte, declaro que el trabajo que aquí presento es de plena autoría, es un esfuerzo realizado de forma personal, académica e intelectual con plenos elementos de originalidad y creatividad. Garantizó que no contiene citas, ni transcripciones de forma indebida que puedan devenir en plagio, pues se ha utilizado la normativa vigente de la American Psychological Association (APA). Las citas y transcripciones utilizadas se realizan en el marco de respeto a las obras de

terceros. La responsabilidad directa en el diseño y presentación son de competencia exclusiva, por tanto, eximo de toda responsabilidad a la Universidad Técnica Nacional.

Consciente de que las autorizaciones no reprimen mis derechos patrimoniales como autor del trabajo. Confío en la que Universidad Técnica Nacional respete y haga respetar mis derechos de propiedad intelectual.

Firma del estudiante



Cédula 1-1658-0582

Día: 23-08-23