

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“VALORIZACIÓN DE LA CASCARILLA DE  
CACAO, RESIDUO DE LA INDUSTRIA  
CHOCOLATERA, PARA SU EMPLEO COMO  
SUSTRATO EN PROCESOS  
FERMENTATIVOS”**

**TRABAJO FIN DE MASTER  
POR**

**CRISTINA BORRALLO MAYORAL**

**JULIO, 2019**



## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis tutoras, Adriana Laca y Amanda Laca, por su paciencia, comprensión y dedicación durante la realización de este trabajo, por la transmisión de sus conocimientos a lo largo de todo el proyecto.*

*A Ana, por enseñarme todo lo que sabía, por sus consejos y ayudarme siempre que era necesario.*

*A Marta, por su ayuda desinteresada en todo momento.*

*A mis compañeros de máster, en especial a Ángela, Fernando, Sonia y Sara por el compañerismo depositado durante todo el curso y, además de compañeros, convertirse en amigos.*

*A mis compañeras de piso, por aguantarme y comprenderme después de un largo día de laboratorio.*

*A mi familia y amigos, por vencer siempre la distancia y confiar en mí en todo momento.*

*En especial, gracias a mis padres, sin ellos no hubiese sido posible llegar hasta aquí.*

*Gracias*

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN.....  | 1  |
| ABSTRACT .....  | 2  |
| LISTA DE FIGURAS .....  | 3  |
| LISTA DE TABLAS.....  | 5  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 6  |
| 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....   | 9  |
| 2.1. Residuos agroalimentarios .....  | 9  |
| 2.2. Carbohidratos .....  | 10 |
| 2.2.1. Tipos de carbohidratos .....   | 11 |
| 2.2.1.1. Monosacáridos .....  | 11 |
| 2.2.1.2. Oligosacáridos .....   | 11 |
| 2.2.1.3. Polisacáridos.....   | 12 |
| 2.3. Tratamiento de los residuos lignocelulósicos para su posterior fermentación..... | 14 |
| 2.3.1. Hidrólisis .....   | 14 |
| 2.3.1.1. Hidrólisis ácida.....  | 15 |
| 2.3.1.2. Hidrólisis básica o alcalina.....  | 15 |
| 2.3.1.3. Hidrólisis enzimática.....   | 15 |
| 2.3.1.4. Hidrólisis hidrotérmica.....   | 16 |
| 2.3.2. Generación de compuestos inhibidores.....                                      | 16 |
| 2.4. Fermentación.....  | 18 |
| 2.5. Materia prima: cacao.....  | 19 |
| 2.5.1. Mercado y comercialización del cacao .....                                     | 19 |
| 2.5.2. Procesamiento del cacao .....  | 21 |
| 2.5.3. Cascarilla de cacao .....  | 22 |
| 2.6. Industria del chocolate en España. ....  | 24 |
| 2.7. Industria del chocolate en Asturias .....  | 25 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 26 |
| 3.1. Determinación de azúcares solubles en el material de partida.....                | 26 |
| 3.2. Tratamientos de hidrólisis .....   | 27 |
| 3.2.1. Hidrólisis hidrotérmica.....   | 27 |
| 3.2.2. Hidrólisis ácido-térmica .....   | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3. Hidrólisis básica o alcalino-térmica .....   | 28 |
| 3.3. Tratamiento para la extracción de azúcares potenciales .....                               | 28 |
| 3.4. Métodos para la cuantificación de azúcares .....   | 29 |
| 3.4.1. Método Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales.....                   | 30 |
| 3.4.2. Método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para cuantificación de azúcares reductores. ... | 31 |
| 3.5. Ecuación para el cálculo de carbohidratos .....  | 33 |
| 3.6. Determinación del contenido en humedad .....   | 34 |
| 3.7. Determinación del contenido en inhibidores.....  | 34 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 37 |
| 4.1. Caracterización de los materiales de partida .....   | 37 |
| 4.1.1. Análisis del contenido en humedad.....   | 37 |
| 4.1.2. Azúcares totales y reductores solubles.....  | 38 |
| 4.1.3. Azúcares potenciales .....   | 38 |
| 4.2. Azúcares totales y reductores extraídos tras los tratamientos de hidrólisis.....           | 40 |
| 4.2.1. Hidrólisis hidrotérmica.....   | 40 |
| 4.2.2. Hidrólisis ácido-térmicas.....   | 43 |
| 4.2.3. Hidrólisis básico-térmicas. ....   | 45 |
| 4.3. Análisis de resultados .....   | 48 |
| 4.3.1. Sólido solubilizado.....   | 48 |
| 4.3.2. Eficacia de extracción de azúcares reductores .....                                      | 49 |
| 4.3.3. Presencia de inhibidores.....  | 53 |
| 5. CONCLUSIONES .....   | 59 |
| 6. BIBLIOGRAFIA.....  | 60 |

## **RESUMEN**

La actividad humana es la causa fundamental de la contaminación ambiental. Concretamente, la generación de residuos es uno de los principales problemas de la sociedad actual, siendo los residuos agroalimentarios de especial interés debido al volumen generado a nivel mundial

Este proyecto forma parte de una línea de investigación que busca reducir el impacto ambiental de los residuos agroalimentarios, mediante su empleo en bioprocesos. En el presente trabajo, se evaluó la posibilidad de utilizar cascarilla de cacao, residuo procedente de la industria chocolatera, como sustrato en procesos fermentativos. Para ello, se llevaron a cabo diferentes tratamientos de hidrólisis, con el fin de maximizar la extracción de azúcares fermentables. Los caldos obtenidos en los diferentes ensayos realizados fueron caracterizados en base a su contenido en azúcares totales y reductores. Asimismo, se analizó la posible presencia de compuestos inhibidores (furfural, HMF y ácido acético) del proceso de fermentación.

El tratamiento óptimo, teniendo en cuenta la cantidad de azúcares reductores obtenida, fue la hidrólisis ácido-térmica con ácido sulfúrico al 10%, a una temperatura de 135°C y un tiempo de 5 min. La cantidad de azúcares reductores que se extrajo con estas condiciones fue de 12.6 g de azúcar por cada 100 g de residuo seco, lo que supone una eficacia de extracción de casi el 48% (p/p) respecto al contenido en azúcares reductores potenciales. Por el contrario, el tratamiento menos eficaz fue la hidrólisis básico-térmica con NaOH al 5%, a una temperatura de 135°C y un tiempo de 5 min, siendo el porcentaje de eficacia de extracción en este caso de aproximadamente el 6% respecto al contenido en azúcares reductores potenciales. En todos los caldos obtenidos a partir de las hidrólisis térmicas y ácido-térmicas, se detectaron los tres compuestos inhibidores analizados. Sin embargo, debe señalarse que en todos los casos su concentración estaba por debajo de la cantidad mínima inhibitoria descrita para microorganismos tales como las levaduras, por lo que la presencia de estos compuestos no supondría un problema para el posterior proceso fermentativo.

## **ABSTRACT**

Human activity is the principal responsible of environmental pollution. Specifically, waste generation is one of the main concerns of current society. Agro-industrial wastes result of great interest due to the volume of these residues generated worldwide.

This project is included in a researching line focused on reducing the environmental impacts of agro-industrial wastes by means of its employment in bioprocesses. In this work, the possible use as substrate in fermentative processes of cocoa shells, a waste of the chocolate industry, has been evaluated. Different hydrolysis treatments have been carried out with the aim to maximise the extraction of fermentable sugars. The amount of total sugars and reducing sugars in the final broths obtained from the different treatments have been measured. In addition, the possible presence of fermentation inhibitors (furfural, HMF and acetic acid) has also been analysed.

Considering the amount of reducing sugars obtained, the best results were achieved with the acid-thermal hydrolysis employing 10% sulfuric acid at a temperature of 135°C during 5 minutes. The amount of reducing sugars extracted with this treatment was 12.6 g per 100 g of waste dry weight, which means an extraction yield of almost 48% (w/w) with respect to the potential amount of reducing sugars. On the contrary, the worst results were obtained with the basic-thermal hydrolysis using 5% NaOH at a temperature of 135°C during 5 minutes. In this case, the extraction yield with respect to the potential amount of reducing sugars was approximately 6% (w/w). The three inhibitors analysed were detected in all final broths obtained from thermic and acid-thermic hydrolysis. However, it should be remarked that, in all cases, the amount of these compounds were at levels lower than the minimum inhibitory concentrations reported for microorganisms such as yeasts. Hence, the presence of these inhibitors would not imply any impediment for the subsequent fermentative processes.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |   |                          |    |
|-------------------|---|--------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Jerarquía de residuos.  | Fuente: Ley 22/2011..... | 6  |
| <b>Figura 2.</b>  | Diagrama de la cadena de suministro desde la producción primaria hasta el consumidor final. Fuente: WEB5.....   |                          | 9  |
| <b>Figura 3.</b>  | Estructura de la glucosa y la fructosa. Fuente: WEB3.....   |                          | 11 |
| <b>Figura 4.</b>  | Formación del enlace glucosídico. Fuente: WEB2.....   |                          | 12 |
| <b>Figura 5.</b>  | Formación de la sacarosa a partir de glucosa y fructosa. Fuente: WEB2.....  |                          | 12 |
| <b>Figura 6.</b>  | Formación de la lactosa a partir de glucosa y galactosa. Fuente: WEB2.....  |                          | 12 |
| <b>Figura 7.</b>  | Estructura de la celulosa formada por la unión de unidades de glucosa. Fuente: WEB2...13  |                          |    |
| <b>Figura 8.</b>  | Estructura química de la hemicelulosa. Fuente: Loardo et al., (2016).....   |                          | 13 |
| <b>Figura 9.</b>  | Poder reductor de los disacáridos. Fuente: WEB4.....  |                          | 14 |
| <b>Figura 10.</b> | Formación de los principales compuestos inhibidores. Fuente: Kim, D. 2018.....  |                          | 17 |
| <b>Figura 11.</b> | Reacción de la fermentación alcohólica.....   |                          | 18 |
| <b>Figura 12.</b> | Partes de la semilla de cacao. Fuente: Beckett, 2008.....   |                          | 19 |
| <b>Figura 13.</b> | Distribución de la producción de <i>Theobroma cacao</i> . Fuente: Mojica, et al., 2006.....   |                          | 20 |
| <b>Figura 14.</b> | Principales países productores de <i>Theobroma Cacao</i> . Fuente: BATISTA, Lépido, 2009.....   |                          | 20 |
| <b>Figura 15.</b> | Consumo de cacao per cápita según el país. Fuente: CUÉLLAR G, Oscar A., 2010....  |                          | 20 |
| <b>Figura 16.</b> | Esquema de los métodos de tostado de cacao. Fuente: Beckett, 2008.....  |                          | 22 |
| <b>Figura 17.</b> | Datos en volumen ( $t_m$ ) del sector del chocolate en España en el año 2017. Fuente: WEB8.....   |                          | 24 |
| <b>Figura 18.</b> | Tipos de productos derivados del cacao (%). Fuente: WEB8.....   |                          | 24 |
| <b>Figura 19.</b> | Evolución de ventas en Chocolates del Norte S.A. Fuente: WEB10.....   |                          | 25 |
| <b>Figura 20.</b> | Centrífuga (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific).....  |                          | 26 |
| <b>Figura 21.</b> | pH-metro (Basic 20+, Crison Instruments).....   |                          | 27 |
| <b>Figura 22.</b> | Muestras de cascarilla de cacao en la extracción de azúcares potenciales, antes de autoclavar (izquierda), y después (derecha).....                           |                          | 29 |
| <b>Figura 23.</b> | Espectrofotómetro Hach DR/2400 para azúcares totales (izquierda) y espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1300/1500 para azúcares reductores (derecha).....   |                          | 30 |
| <b>Figura 24.</b> | Recta de calibrado para la determinación de carbohidratos totales.....  |                          | 31 |
| <b>Figura 25.</b> | Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los carbohidratos totales. De derecha a izquierda: blanco, 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, 100ppm..... |                          | 31 |
| <b>Figura 26.</b> | Recta de calibrado para la determinación de carbohidratos reductores.....   |                          | 32 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 27.</b> Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los carbohidratos reductores. De izquierda a derecha: blanco, 200ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm, 1000ppm.....   | 32 |
| <b>Figura 28.</b> Equipo HPLC Agilent 1200 empleado en el proyecto.....   | 35 |
| <b>Figura 29.</b> Recta de calibrado para la determinación del contenido en ácido acético.....  | 36 |
| <b>Figura 30.</b> Recta de calibrado para la determinación del contenido en HMF.....  | 36 |
| <b>Figura 31.</b> Azúcares potenciales de la cascarilla de cacao expresados en g azúcar/100 g residuo seco.....   | 39 |
| <b>Figura 32.</b> Cantidad de azúcares reductores potenciales, solubles totales y solubles reductores. Estos últimos obtenidos a partir del residuo sin tratamiento de hidrólisis.....  | 40 |
| <b>Figura 33.</b> Cantidad de azúcares extraídos mediante tratamiento hidrotérmico a 135°C en función del tiempo de tratamiento.....  | 41 |
| <b>Figura 34.</b> Azúcares solubles extraídos de la muestra sin tratamiento (en verde), azúcares totales y reductores obtenidos a partir del residuo tras los tratamientos de hidrólisis hidrotérmica a 135°C (en amarillo).....                                    | 42 |
| <b>Figura 35.</b> Azúcares solubles extraídos de la muestra sin tratamiento (en verde), azúcares totales y reductores obtenidos a partir del residuo tras los tratamientos de hidrólisis ácido térmicas con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% (en amarillo)..... | 44 |
| <b>Figura 36.</b> Cantidad de azúcares extraídos tras las hidrólisis con ácido a distintas concentraciones.....   | 45 |
| <b>Figura 37.</b> Azúcares solubles extraídos de la muestra sin tratamiento (en verde), azúcares totales y reductores obtenidos a partir del residuo tras los tratamientos de hidrólisis básico- térmicas con NaOH al 5% (en amarillo).....                         | 47 |
| <b>Figura 38.</b> Porcentajes solubilizados con respecto al tiempo de las diferentes hidrólisis hidrotérmicas, básicas y ácidas con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5%.....   | 49 |
| <b>Figura 39.</b> Comparación de las eficacias (%) de las hidrólisis hidrotérmicas, con ácido al 5% y con NaOH al 5%.....   | 52 |
| <b>Figura 40.</b> Eficacias (%) de las hidrólisis ácido térmicas empleando diferentes concentraciones de ácido.....   | 52 |
| <b>Figura 41.</b> Cromatograma del patrón de 25 ppm de HMF y furfural.....  | 53 |
| <b>Figura 42.</b> Cromatograma para el ácido acético en el tratamiento con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% durante 40 min.....   | 53 |
| <b>Figura 43.</b> Concentración de ácido acético (ppm) en las diferentes hidrólisis hidrotérmicas.....  | 55 |
| <b>Figura 44.</b> Concentración de ácido acético (ppm) en las hidrólisis a diferentes concentraciones de ácido.....   | 55 |
| <b>Figura 45.</b> Concentración de HMF (ppm) en las hidrólisis a diferentes concentraciones de ácido...   | 57 |

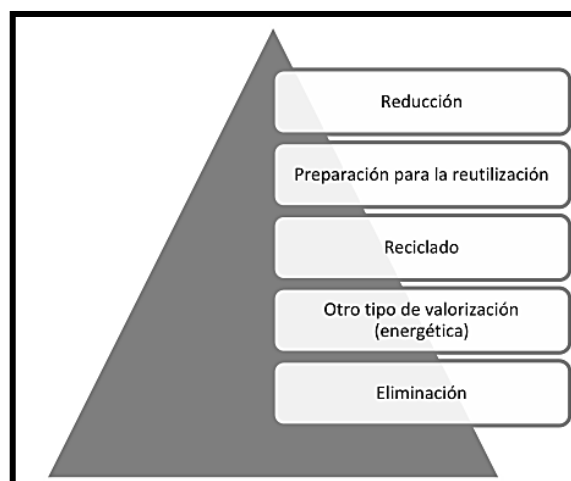


## LISTA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Análisis proximal de la cascarilla de cacao según trabajos de varios autores.....  | 23 |
| <b>Tabla 2.</b> Humedad de la cascarilla de cacao expresada en porcentaje con su desviación típica.....  | 37 |
| <b>Tabla 3.</b> Azúcares solubles sin tratamiento de hidrólisis expresados en g azúcar por 100 g de residuo seco.....  | 38 |
| <b>Tabla 4.</b> Azúcares potenciales expresados en g azúcar por 100 g de residuo seco.....   | 39 |
| <b>Tabla 5.</b> Azúcares totales y reductores obtenidos mediante las hidrólisis hidrotérmicas realizadas a 135°C y distintos tiempos expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales.....                    | 41 |
| <b>Tabla 6.</b> Datos obtenidos tras las hidrólisis ácido térmicas con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5%. Contenido de azúcares totales y reductores expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales..... | 43 |
| <b>Tabla 7.</b> Azúcares totales y reductores obtenidos tras las hidrólisis acido-térmicas realizadas con distinta concentración de ácido expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales.....               | 45 |
| <b>Tabla 8.</b> Valores de pH al adicionar H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o NaOH.....  | 46 |
| <b>Tabla 9.</b> Azúcares totales y reductores obtenidos tras las hidrólisis básico-térmicas realizadas a 135°C y distintos tiempos expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales.....                      | 47 |
| <b>Tabla 10.</b> Peso húmedo y seco de los sólidos hidrolizados (g), % solubilizado.....   | 48 |
| <b>Tabla 11.</b> Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis hidrotérmicas (%).....  | 50 |
| <b>Tabla 12.</b> Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis ácido térmicas con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% a diferentes tiempos (%).....   | 50 |
| <b>Tabla 13.</b> Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis ácido térmica con ácido a distintas concentraciones (%).....  | 51 |
| <b>Tabla 14.</b> Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis básicas con NaOH a distintos tiempos (%).....   | 51 |
| <b>Tabla 15.</b> Concentración en ppm del ácido acético y el área dada por el cromatograma (mAU)....   | 54 |
| <b>Tabla 16.</b> Concentración en ppm del ácido acético y el área dada por el cromatograma (mAU)....   | 56 |

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental está originada fundamentalmente por causas derivadas de la actividad humana, siendo la generación de residuos uno de los principales problemas de la sociedad actual (Isa et al., 2006). A pesar de que el origen de los problemas de contaminación es tan antiguo como el hombre, no fue hasta los años setenta cuando comenzaron a aparecer las primeras normas relacionadas con la gestión medioambiental. En España, la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados (BOE, 2011) establece una jerarquía de residuos para conseguir el mejor resultado ambiental global con el siguiente orden de prioridad: reducción, preparación para la reutilización, reciclado, otro tipo de valorización (energética) y eliminación (Figura 1). En esta ley, la valorización se define como “cualquier operación cuyo resultado principal sea que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales, que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular, o que el residuo sea preparado para cumplir esa función en la instalación o en la economía en general”.



**Figura 1.** Jerarquía de residuos. Fuente: Ley 22/2011.

Haciendo referencia a los residuos alimentarios, estos, son un problema mundial importante por diferentes razones: económicas, ambientales y de seguridad alimentaria. Concretamente, se estima que aproximadamente el 26% de los desechos de alimentos se genera a partir de la industria de bebidas, seguido por la industria láctea (21%), fruta/producción de hortalizas (15%), procesamiento de cereales (13%), procesamiento/conservación de productos cárnicos (8%) y la fabricación y el procesamiento de aceites vegetales y animales (4%) (Baiano, 2014).

Los residuos alimentarios pueden definirse como “aquellos materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o

transformación para originar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social”. El extracto sólido de los desechos alimentarios está formado esencialmente por carbohidratos, proteínas, lípidos y pequeñas cantidades de vitaminas y minerales, lo que hace que sean unos residuos muy interesantes desde un punto de vista de su posible revalorización, sin embargo, el problema al que se enfrentan estos desechos es que no existe una clara conciencia ambiental para su gestión (Saval, 2012).

Una gran parte de los residuos agroindustriales corresponde a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa por lo que podrían ser empleados como sustratos para generar diferentes compuestos de valor añadido, tales como bioalcoholes. Para obtener los azúcares de estos residuos se necesita hidrolizar los polisacáridos a monómeros, lo que hace necesario llevar a cabo un proceso de pretratamiento (mecánico, térmico, fisicoquímico, químico o biológico) (Vargas-Corredor & Pérez-Pérez, 2018). El principal inconveniente de los procesos de hidrólisis es que se pueden generar algunos compuestos que actúan como inhibidores de una posterior fermentación, como el hidroximetilfurfural (HMF) y el furfural, entre otros (Correa et al., 2012).

Teniendo en cuenta el gran volumen del mercado de cacao (*Theobroma cacao*), a nivel mundial es evidente que en la industria del cacao/chocolate se generan elevadas cantidades de residuos. Las cascarillas de cacao son las porciones externas de los granos que encierran las semillas, y son un producto de desecho del proceso de tostado durante la producción de chocolate en las industrias chocolateras. Se estima que la producción de cascarilla de cacao es muy significativa, ya que representa el 12%, aproximadamente, de la semilla de cacao (Mendes & Lima, 2007). Teniendo en cuenta la producción mundial de cacao en grano, la generación mundial de estos residuos se puede calcular en aproximadamente 700 mil toneladas al año, que es una cantidad importante (WEB1). Sin embargo, este número podría ser aún mayor si se considera que junto con la cascarilla se eliminan el germen y posiblemente parte de las puntas que están unidas a la cáscara.

La cascarilla de cacao es un residuo que tiene una composición muy interesante desde un punto de vista nutricional: compuestos fenólicos, fibras, azúcares solubles, proteínas, cenizas y un contenido de grasa significativo. Además, cuenta con un perfil lipídico muy similar al de la manteca de cacao (Arlorio et al., 2001; Arlorio et al., 2005; Borchers et al., 2000; Martínez et al., 2012). Debido a su composición este residuo puede emplearse en diferentes aplicaciones (Martínez et al., 2012; Vojvodić et al., 2016), tales como: fertilizante del suelo, proporcionando además un aporte de materia orgánica (Lu F., et al., 2018; Gyedu-Akoto et al., 2015), alimentación animal (Oddoye EOK et al.,

2013; Lateef A, et al., 2008), materia prima para la obtención de carbón activado (Yahya et al., 2015) o sustrato en diferentes bioprocesos (Nazir et al., 2016).

El objetivo fundamental de este trabajo es ensayar distintas técnicas de hidrólisis para la cascarilla de cacao, residuo de la fabricación de chocolate, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de azúcares fermentables, de manera que pueda ser empleado como sustrato en procesos fermentativos. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Ensayar el efecto del tiempo y la temperatura en la eficacia del proceso de hidrólisis
2. Ensayar el efecto de la adición de bases o ácidos, así como su concentración, sobre la eficacia del proceso de hidrólisis.
3. Caracterizar los caldos resultantes en base a su contenido en azúcares fermentables y posible presencia de inhibidores del proceso de fermentación.
4. En función de los resultados obtenidos, determinar las condiciones óptimas para realizar la hidrólisis de la cascarilla de cacao como paso previo a su uso como sustrato.

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. Residuos agroalimentarios

Los alimentos se desperdician a lo largo de toda la cadena de suministro, desde la producción agrícola hasta el consumo final (Figura 2). En los países desarrollados existe mayor índice de producción de residuos, ya que el consumo es más elevado. Por otro lado, en las empresas que conforman el sector agroindustrial, se generan residuos que representan cantidades significativas y son considerados un problema ambiental (Restrepo et al., 2011).



**Figura 2.** Diagrama de la cadena de suministro desde la producción primaria hasta el consumidor final. Fuente: WEB5

En general, las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó. Sin embargo, tienen una característica común que es su elevado contenido en materia orgánica, que en el caso de los residuos lignocelulósicos se encuentra constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina (Saval, 2012).

Gestionar inadecuadamente los residuos procedentes de industrias agroalimentarias ocasiona alteraciones en los diferentes medios abióticos, bióticos y también socioeconómicos, llegando incluso a generar pérdidas económicas para las empresas (Ramírez, 2012). El aprovechamiento de los residuos agroindustriales permite dar solución a diferentes problemas ambientales originados por la generación y gestión de estos residuos. Asimismo, ayuda a disminuir el uso de recursos naturales renovables y no renovables empleados como materia prima en determinados procesos.

Estos residuos pueden ser empleados principalmente para la producción de compost (Hernández et al., 2016), pero también como sustratos en procesos bioenergéticos (bioetanol) (Muñoz et al., 2013). También, aunque en menor medida, pueden ser utilizados en la producción de alimentos para animales (Saval, 2012) u otros productos de interés con un valor añadido, como el carbón activado.

En los últimos años, se han establecido una serie de criterios de selección de residuos para ser aprovechados con fines biotecnológicos, siendo los más importantes los que se citan a continuación:

- Que el principal componente del residuo pueda ser utilizado como sustrato en procesos fermentativos en la industria o bien, que el material pueda ser sometido a extracciones para recuperar alguno de sus componentes.
- Que el residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la obtención de un producto de interés.
- Que no tenga otras aplicaciones o usos que compitan con el proceso que se pretende promover.
- Que no requiera pretratamiento, y en caso de requerirlo, que éste sea sencillo y económico.
- Que sea estable, es decir, que no se descomponga fácilmente bajo las condiciones ambientales del sitio donde se genera.

Existen básicamente tres grupos de tecnologías para la recuperación de residuos agroindustriales:

1. La valorización biológica y química: permite obtener gases, líquidos o sólidos comercializables (pectinas, enzimas, aceites esenciales, etc.) a partir de residuos orgánicos.
2. La obtención de biocombustibles (derivados de desechos) para conseguir combustibles como el bioetanol o el biogás.
3. La valorización térmica, con el fin de reducir el volumen de los residuos utilizando procesos como la incineración o la pirólisis (Yepes et al., 2008).

En el caso de los residuos agroalimentarios no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure una buena gestión desde su generación hasta su disposición final.

## 2.2. Carbohidratos

Los carbohidratos, también denominados hidratos de carbono, glúcidos o azúcares, son biomoléculas formadas por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Generalmente, los carbohidratos, siguen la fórmula química  $(CH_2O)_n$ .

Estas biomoléculas constituyen un porcentaje muy importante de la biosfera, son el componente más abundante en los alimentos y cumplen diversas funciones tales como estructurales, energéticas o de almacenamiento (WEB 2).

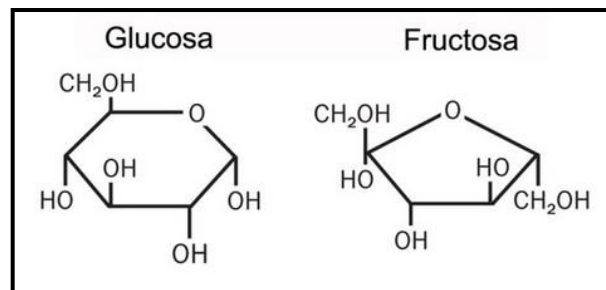
### 2.2.1. Tipos de carbohidratos

Los carbohidratos se pueden clasificar según su grado de polimerización en: monosacáridos (formados por una única molécula), oligosacáridos (grupos de entre 2 y 20 monosacáridos unidos entre sí) y polisacáridos (monosacáridos unidos entre sí en más de 20 unidades) (WEB 2).

#### 2.2.1.1. Monosacáridos

Los monosacáridos son los azúcares más simples y están constituidos por unidades monoméricas sencillas. Estos monómeros siguen la fórmula química general de los carbohidratos, detallada previamente, siendo el valor de  $n$  más bajo igual a 3 dependiendo del número de átomos de carbono. Otra forma para designar los monosacáridos es como aldehídos (aldosas) y cetonas (cetosas) con grupos hidroxilo unidos a su cadena. Teniendo en cuenta la longitud de la cadena carbonada, se tienen: triosas ( $n=3$ ), pentosas ( $n=5$ ), hexosas ( $n=6$ ), etc. (WEB 2).

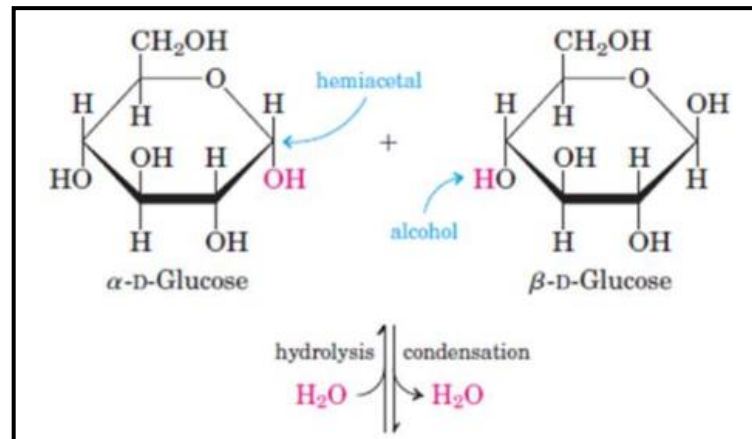
En la Figura 3 se puede observar la estructura de dos de los monosacáridos más frecuentes, la glucosa y la fructosa (WEB 3).



**Figura 3.** Estructura de la glucosa y la fructosa. Fuente: WEB3.

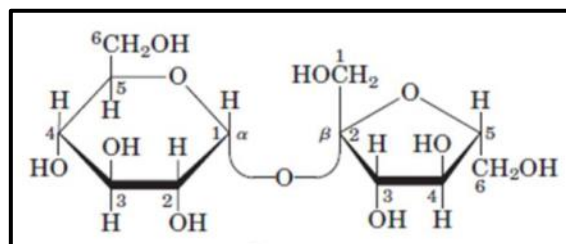
#### 2.2.1.2. Oligosacáridos

Los oligosacáridos son polímeros cortos de azúcar y se forman por la reacción de condensación entre dos unidades monoméricas unidas mediante un enlace glucosídico (Figura 4).

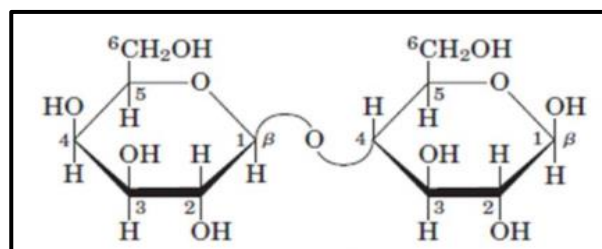


**Figura 4.** Formación del enlace glucosídico. Fuente: WEB2

Dentro de los oligosacáridos, los disacáridos (unión de dos monosacáridos) son los más importantes y abundantes. Dos disacáridos a destacar son la sacarosa (azúcar no reductor) y la lactosa (azúcar reductor) (Figuras 5 y 6).



**Figura 5.** Formación de la sacarosa a partir de glucosa y fructosa. Fuente: WEB2



**Figura 6.** Formación de la lactosa a partir de glucosa y galactosa. Fuente: WEB2

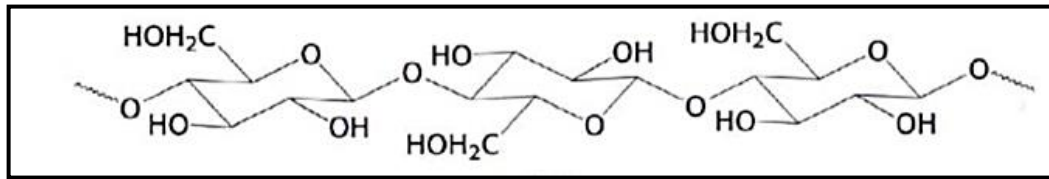
### 2.2.1.3. Polisacáridos

Los polisacáridos, también llamados glicanos, son cadenas conformadas por más de 20 unidades de monosacáridos. Dentro de estas moléculas se pueden distinguir dos grupos:

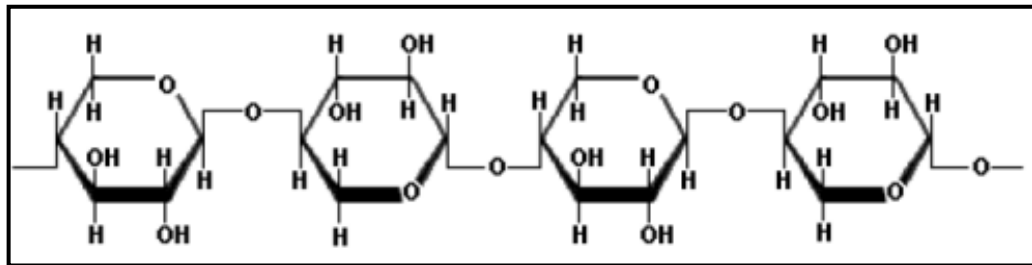
- Homopolisacáridos: Se forman por unidades repetidas del mismo monosacárido. Ejemplos: almidón, glucógeno, celulosa (Figura 7).



- Heteropolisacáridos: La secuencia contiene unidades de diferentes monosacáridos. Ejemplos: hemicelulosas y pectinas (Figura 8) (WEB 2).



**Figura 7.** Estructura de la celulosa formada por la unión de unidades de glucosa. Fuente: WEB2



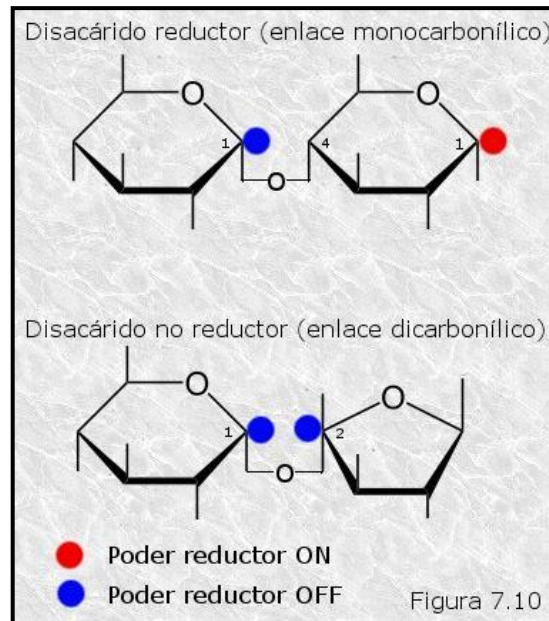
**Figura 8.** Estructura química de la hemicelulosa. Fuente: Loardo et al., (2016)

Para que los azúcares sean directamente fermentables, deben de poseer un carácter reductor. Cuando dos monosacáridos se unen mediante un enlace glucosídico monocarbonílico el disacárido resultante tendrá poder reductor, ya que conserva un carbono carbonílico libre. Por el contrario, si el enlace es dicarbonílico el disacárido resultante, al tener sus dos carbonos carbonílicos implicados en el enlace, habrá perdido el poder reductor (Figura 9) (WEB 4).

Todos los monosacáridos son reductores, junto con la la maltosa y la lactosa, pero la sacarosa es un azúcar no reductor. Esta característica reductora de los azúcares sirve para:

- Diferenciar aldosas de cetosas. Las aldosas tienen en su estructura un grupo formilo (grupo de aldehídos) y las cetosas tienen un grupo oxo (grupo de cetonas).
- Comprobar si la calidad de los productos obtenidos en las fermentaciones es aceptable o no.

Los polisacáridos como el almidón, la celulosa y la hemicelulosa, tienen el grupo carbonilo involucrado en el enlace de los distintos monosacáridos para la formación de la molécula y por tanto pierden el carácter reductor (Gerena, 2013).



**Figura 9.** Poder reductor de los disacáridos. Fuente: WEB4

Los azúcares fermentables son aquellos azúcares capaces de atravesar la pared celular de las levaduras y por lo general estos azúcares son monosacáridos y disacáridos.

Cabe destacar que todos los azúcares reductores (monosacáridos, maltosa y lactosa) son fermentables, sin embargo, no todos los azúcares fermentables son necesariamente reductores (WEB 6).

## 2.3. Tratamiento de los residuos lignocelulósicos para su posterior fermentación

### 2.3.1. Hidrólisis

Muchos de los carbohidratos vegetales están en forma polimérica, por lo que para poder ser utilizados como sustratos en procesos fermentativos deben hidrolizarse a azúcares solubles. La hidrólisis completa de celulosa da el monómero D-glucosa, mientras que a partir de las hemicelulosas se obtienen pentosas y hexosas, como manosa, glucosa, xilosa, etc. La etapa de hidrólisis puede realizarse mediante catálisis química o enzimática, aunque existen otros métodos menos utilizados y poco estudiados como la irradiación gamma y la utilización de microondas, entre otros (Balat, M. 2011).

### 2.3.1.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un procedimiento químico que, mediante el empleo de ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos en sus correspondientes monómeros. Se utilizan ácidos como el HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, siendo este último el más empleado para este tipo de tratamiento. El tratamiento previo con ácido puede llevarse a cabo de dos maneras: alta temperatura y baja concentración de ácido (tratamiento previo con ácido diluido) o a una temperatura baja y alta concentración de ácido (tratamiento previo con ácido concentrado).

El principal inconveniente de los tratamientos a pH bajo (hidrólisis ácida), es la formación de diferentes tipos de inhibidores como el hidroximetilfurfural (HMF), el furfural y ácidos carboxílicos, entre otros (Taherzadeh & Karimi, 2007). Estos compuestos generalmente inhiben el crecimiento y la fermentación microbianos, por tanto su formación debe evitarse, reducirse o eliminarse después del proceso de fermentación por medio del método de detoxificación adecuado.

### 2.3.1.2. Hidrólisis básica o alcalina

La hidrólisis básica es un proceso químico en el que se emplean bases para transformar azúcares complejos en azúcares fermentables. Las bases utilizadas en este tipo de tratamiento son los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio. El tratamiento de materiales lignocelulósicos con NaOH produce un incremento en el área de la superficie interna, una disminución en el grado de polimerización, una disminución de la cristalinidad, la separación de los enlaces estructurales entre la lignina y los carbohidratos y la alteración de la estructura de la lignina (Sun & Cheng, 2002).

### 2.3.1.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo mediante un grupo de enzimas que reciben el nombre de hidrolasas. En realidad, estos catalizadores biológicos presentan un serie de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Esta hidrólisis tiene lugar bajo condiciones suaves (habitualmente pH 4.5, 50°C, agitación suave).

Algunas ventajas de la hidrólisis enzimática con respecto a la hidrólisis química son que no genera corrosión (no se emplean agentes químicos), baja toxicidad de los caldos obtenidos (no produce inhibidores de la posterior fermentación), costos de equipamiento menores y rendimientos mayores, Sin embargo, necesita tiempos de reacción relativamente largos (de varias horas) y el coste de los enzimas suele ser elevado (aunque se emplean en pequeñas cantidades). Otro inconveniente importante es que los monosacáridos y disacáridos obtenidos inhiben la hidrólisis enzimática a diferencia de la hidrólisis ácida en la que los productos finales no inhiben el proceso (Linde et al., 2007).

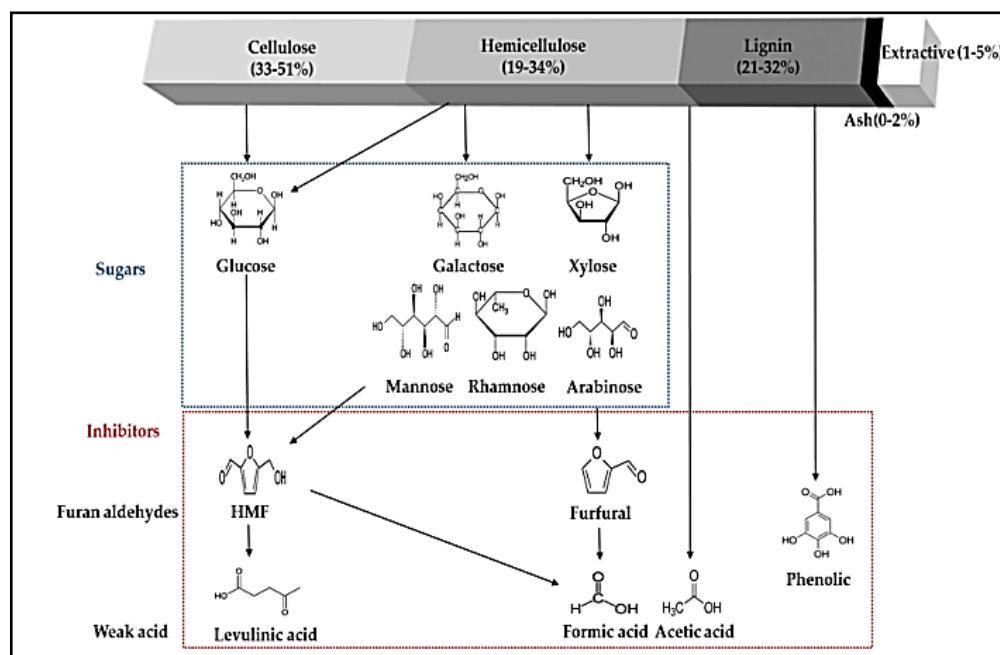
#### 2.3.1.4. Hidrólisis hidrotérmica

El residuo de partida se mezcla con agua para obtener una relación p/v determinada, de la cual dependerá el resultado final. Esta mezcla de muestra y agua se somete a altas temperaturas y presiones. Es un modelo de hidrólisis con grandes ventajas entre las que se encuentran: se generan cantidades muy bajas o nulas de subproductos inhibidores (HMF, furfural, ácido acético) al no contener ácidos ni bases, disminución del impacto ambiental, pH moderados que producen menos daños en los equipos, no se necesita un proceso de recuperación de ácidos o bases para la posterior etapa de fermentación (Díaz, 2015).

#### 2.3.2. Generación de compuestos inhibidores

Como se ha mencionado anteriormente, los tratamientos con elevada temperatura, presión o el uso de ácidos pueden llevar a la formación de compuestos inhibidores del crecimiento microbiano en la posterior fermentación. Esto conlleva a una disminución del rendimiento del proceso fermentativo. La producción de estos inhibidores también está determinada por el tipo de material de partida empleado (Hamelinck et al., 2005).

Estos compuestos inhibidores incluyen el furfural, el hidroximetilfurfural (HMF) y el ácido acético. El furfural es un producto de deshidratación de las pentosas (xilosa y arabinosa), el HMF es un producto de deshidratación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y el ácido acético se forma durante la descomposición inicial de las hemicelulosas (Romero et al., 2007) (Figura 10). Tanto el HMF como el furfural son metabolizados por bacterias y por levaduras produciendo efectos nocivos sobre estos microorganismos. Algunos de dichos efectos provocados por el furfural son: la reducción de la tasa específica de crecimiento, la disminución de la productividad volumétrica y específica de producto de fermentación y descenso de la producción de biomasa. Los efectos provocados por el HMF son los mismos que los del furfural, pero en menor medida ya que la toxicidad sobre los microorganismos de este compuesto es más reducida (Bernier Oviedo, D. J., & Rincón Moreno, J. A. 2012).



**Figura 10.** Formación de los principales compuestos inhibidores. Fuente: Kim, D. 2018

Para eliminar o disminuir la concentración de estos compuestos tóxicos en el caldo final se puede llevar a cabo un proceso de detoxificación. Además de eliminar o disminuir la concentración, con esta técnica se pueden transformar los inhibidores en otros compuestos no tóxicos para la posterior fermentación. La elección de un proceso de detoxificación u otro depende del pretratamiento empleado, el tipo de material y el costo de operación de la técnica elegida. Los métodos de detoxificación se clasifican en:

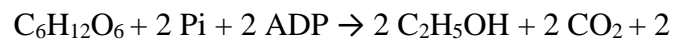
- **Métodos biológicos:** Uso de enzimas o microorganismos específicos que transforman el compuesto inhibidor en otro compuesto. Estos métodos ofrecen elevadas ventajas económicas y ambientales (Mussatto & Roberto, 2004).
- **Métodos físico-químicos:** entre los distintos métodos físicos se incluyen la concentración de hidrolizado mediante la evaporación del vacío y la adsorción en carbón activo mediante intercambio iónico (Bernier Oviedo, D. J., & Rincón Moreno, J. A. 2012). Utilizando el primer método mencionado se reduce el contenido de los compuestos volátiles tales como el ácido acético y el furfural, entre otros (Sánchez & Cardona, 2005). El método químico más utilizado es la precipitación de los compuestos tóxicos e ionización de algunos inhibidores por debajo de ciertos valores de pH.

#### 2.4. Fermentación

Una vez obtenidos los azúcares fermentables tras los tratamientos de hidrólisis y eliminados los compuestos inhibidores, en el caso de que los hubiera, se lleva a cabo el proceso fermentativo. La fermentación es un proceso en el que se presentan cambios químicos y físicos en un sustrato de naturaleza orgánica. Se puede decir que es una respiración en ausencia de oxígeno, con menor liberación de energía que si se tratase de un proceso aerobio (Baena & García 2012). El proceso de fermentación a elevadas temperaturas presenta una serie de beneficios como las altas tasas de producción, la recuperación facilitada del producto, la utilización de una amplia gama de sustratos y el bajo riesgo de contaminación (Torry-Smith, 2002).

Existen diferentes tipos de fermentación dependiendo del microorganismo responsable, el sustrato y las condiciones, pero una de las más conocidas es la fermentación alcohólica para producir bioetanol, llevada a cabo por levaduras.

La fermentación alcohólica es un proceso biológico anaerobio, exotérmico, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP, que utilizan las levaduras en su metabolismo (Riaño, 2010).



**Figura 11.** Reacción de la fermentación alcohólica

El microorganismo ideal debería tener una amplia utilización de sustratos, alto rendimiento y productividad de etanol, tolerancia a los inhibidores presentes en los hidrolizados y a altas concentraciones de etanol (Hahn-Hagerdal et al., 2007). La levadura más usada es la *Sacharomyces cerevisiae*, aunque también se han llevado a cabo investigaciones en las que se ha usado la bacteria *Zymomonas mobilis*. Estas investigaciones se han realizado porque la levadura del género *Sacharomyces* solo es capaz de fermentar hexosas y no pentosas. (Garzón et al., 2009). Un análisis llevado a cabo por Montañez et al., (2011) demostró que *Zymomonas mobilis* degradaba una mayor cantidad de azúcares reductores y por lo tanto producía una mayor cantidad de bioetanol.

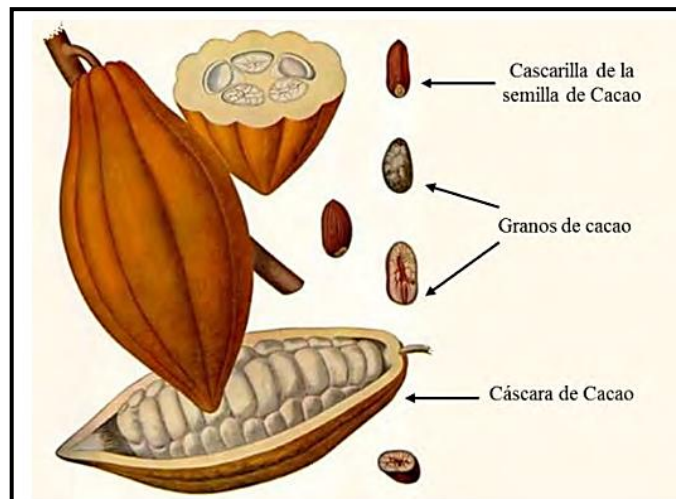
La utilización de los microorganismos mencionados presenta una desventaja, ya que son incapaces de utilizar la xilosa, el principal azúcar de cinco carbonos derivado de la hemicelulosa. Otros microorganismos conocidos por fermentar la xilosa a etanol, como las bacterias entéricas y ciertas

levaduras se caracterizan por los bajos rendimientos de etanol generado y su tendencia a reasimilarlo (Rogers et al., 2007; Talebnia & Taherzadeh, 2006).

### 2.5. Materia prima: cacao

El cacao es el nombre común del árbol *Theobroma cacao* y de sus frutos. El grano de cacao tiene un papel importante como materia prima en la industria alimentaria, sobre todo en el sector de confitería, en la industria cosmética y farmacéutica.

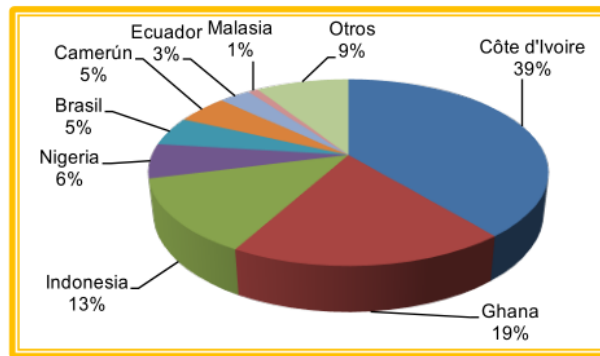
El fruto del cacao está compuesto de una concha externa llamada cáscara y dentro de ella se encuentra el mucílago, que es una pulpa aromática constituida por células esponjosas rica en azúcares. Esta pulpa rodea al grano de cacao, sin embargo, el grano se encuentra protegido por una concha fibrosa llamada cascarilla (Figura 12) (Soto, 2012).



**Figura 12.** Partes de la semilla de cacao. Fuente: Beckett, 2008

#### 2.5.1. Mercado y comercialización del cacao

El cacao es producido por un buen número de países en el mundo, aunque se concentra especialmente en las zonas tropicales. En concreto, su cultivo predomina especialmente en África del Oeste, Asia, Sur y Centro América (Figura 13). En el mundo, los niveles anuales de producción han cambiado de forma considerable respecto al valor de tendencia, debido principalmente a la influencia de factores meteorológicos (Mojica et al., 2006).



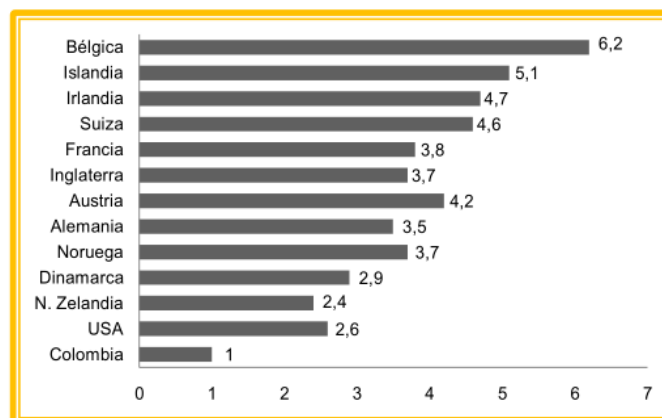
**Figura 13.** Distribución de la producción de *Theobroma cacao*. Fuente: Mojica, et al., 2006

En la Figura 14 se muestra la distribución mundial de los países productores de cacao, destacándose los países de América del Sur, América Central, México, el Caribe, África, Asia y Oceanía; los cuales cuentan con tierras de bosques húmedos tropicales (BATISTA, Lérido, 2009).



**Figura 14.** Principales países productores de *Theobroma Cacao*. Fuente: BATISTA, Lérido, 2009.

Como se observa en la Figura 15, los más grandes consumidores de cacao y de chocolate son los europeos y los estadounidenses, aunque cada país tiene sus propias preferencias por los diferentes productos.



**Figura 15.** Consumo de cacao per cápita según el país. Fuente: CUÉLLAR G, Oscar A., 2010.



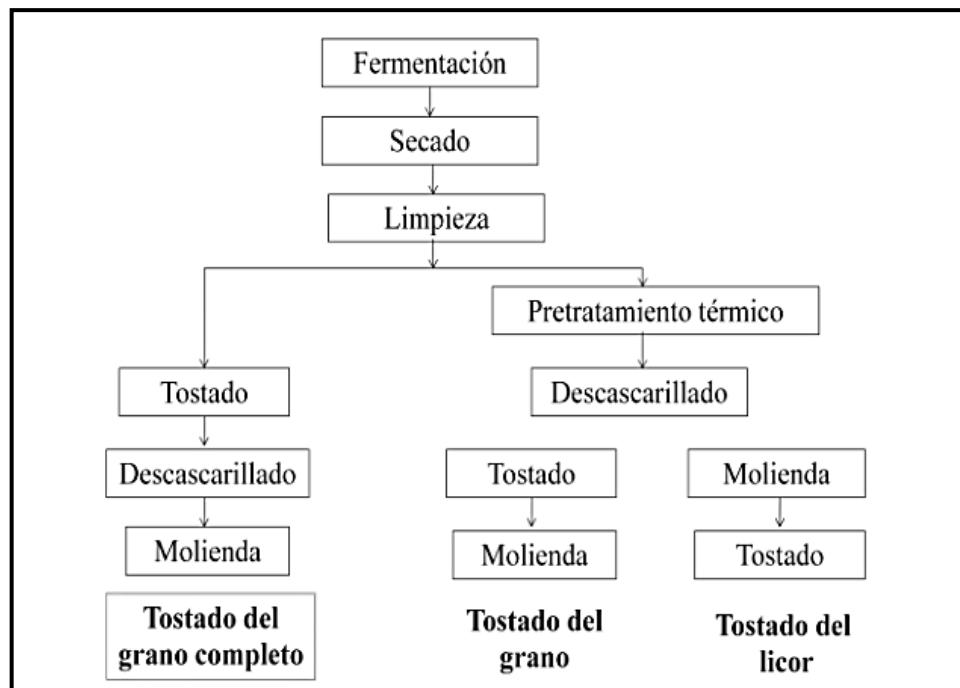
### 2.5.2. Procesamiento del cacao

En la industria alimentaria, el procesamiento de las semillas de cacao consta de varias etapas. En el campo, el productor se encarga de cultivar el fruto y su limpieza, donde se rompe la cáscara y el mucílago es extraído para la obtención del grano de cacao (Beckett, 2008).

Una vez extraído el grano de cacao, este puede sufrir una etapa de fermentación, donde se producen distintos compuestos que le dan un sabor y olor característico, esenciales para la elaboración de productos tales como el chocolate. Seguidamente, los granos se llevan al secado donde son expuestos al sol o en máquinas de secado, de manera que la humedad del grano se reduce entre un 6% y un 8%. Finalmente, las semillas son transportadas a la industria en sacos de aproximadamente 60 kg, vigilando constantemente la humedad del lugar de almacenamiento (Beckett, 2008).

El primer paso del procesamiento del cacao en la planta industrial es la limpieza del grano, aquí se eliminan las impurezas para asegurar el rendimiento de operaciones posteriores y la calidad del producto. En esta etapa se combinan diferentes métodos para asegurar la eliminación de todos los contaminantes: succión para extraer tierra, imanes para retirar metales y vibración para retirar rocas pesadas (De la Mota, 2008).

Después de la limpieza existen variantes en el tratamiento del grano, dependiendo principalmente, de la utilidad o especificaciones que se requieran en el producto. Estas variaciones se refieren al orden en que son ejecutadas las operaciones (Beckett, 2008). En la Figura 16, se observan tres métodos de tostado: el tostado del grano completo (cascarilla y grano), el tostado del grano solamente (luego del descascarillado) y el tostado del licor de cacao. El tostado es responsable de las características de productos como el chocolate, además permite eliminar la humedad remanente en el grano, lo que favorece la calidad del producto desde un punto de vista microbiológico.



**Figura 16.** Esquema de los métodos de tostado de cacao. Fuente: Beckett, 2008.

Previamente al descascarillado, se lleva a cabo un tratamiento térmico que consiste en la exposición rápida de la semilla a una fuente de calor intensa como vapor o radiación. Es importante tener en cuenta que este proceso no afecta al sabor ni calidad del grano debido a su corta y rápida acción (Beckett, 2008). Este pretratamiento térmico favorece el descascarillado de la semilla, ya que la humedad que pierde el grano ejerce una presión en la cascarilla (hinchamiento), separándola del mismo. Otra ventaja que ofrece este tratamiento por calor es que conduce a un tostado más homogéneo porque el material a ser sometido al proceso es similar en tamaño. Luego, por vibración, esta cascarilla es desviada de la línea principal de producción quedando como un producto de desecho (Beckett, 2008; De la Mota, 2008).

Cuando se tiene el grano tostado y sin cascarilla, este ya está listo para la molienda. De esta etapa se obtiene el licor de cacao, el cual se hace pasar por un filtro prensa para así obtener lo que se llama torta húmeda remanente y la grasa de cacao. Finalmente, ambos productos intermedios son utilizados para la elaboración de chocolates, polvos de cacao y demás productos (De la Mota, 2008).

### 2.5.3. Cascarilla de cacao

La cascarilla de cacao se considera un subproducto industrial de la producción de cacao que generalmente se utiliza poco o se considera un desecho, y se usa principalmente como combustible para calderas (Arlorio et al., 2005; Fowler, 2009), aunque existen aplicaciones en la alimentación animal y la preparación de fertilizantes, entre otras (Ntiamoah & Afrane, 2008; Prasad et al., 2004).

La composición de la cascarilla de cacao es bastante variable, al igual que la de los granos de cacao, y dependerá, entre otros factores, de su origen y del procesamiento al que se haya sometido.

El contenido de proteína presentado por la cascarilla de cacao es muy similar al de las semillas de cacao (Okiyama et al., 2017). Sin embargo el 90% del nitrógeno alfa amino en la cáscara extraída está fuertemente unido a los polifenoles oxidados que se encuentran en la cascarilla, que se convierten en polifenoquinonas, por tanto, solo alrededor del 1% de la proteína en la cascarilla de cacao existe en la condición libre.

Las cenizas de cascarilla de cacao contienen aproximadamente 7% de sodio, 3% de potasio, 33% de carbonato de sodio y un pH de 10.8. Estas cenizas pueden ser utilizadas en la fabricación de jabón, ya que con ellas se puede obtener la potasa de cascarilla en lugar de utilizarse KOH químico.

El nivel de azúcares solubles en la cascarilla de cacao parece ser mínimo, lo que representa una ventaja de este producto, considerando su valor calórico reducido (Lecumberri et al., 2007). El contenido de fibra de este residuo del cacao es casi tres veces mayor que el de las semillas y constituye más del 50% del material total (Okiyama et al., 2017).

La cantidad y el perfil de los compuestos fenólicos presentes en la cubierta son muy interesantes debido a que esta clase de compuestos puede tener importantes propiedades antioxidantes.

**Tabla 1.** Análisis proximal de la cascarilla de cacao según trabajos de varios autores

| <b>Parámetros</b>   | <b>(Sangronis et al., 2014)</b> | <b>(Villamizar y López, 2016)</b> | <b>(Soto Pereira, 2012)</b> | <b>(Cardona et al., 2002)</b> |
|---------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Humedad (%)         | 3.46-5.08                       | 6.7                               | 4.31                        | 6                             |
| Cenizas (%)         | 7.51-8.09                       | 11.4                              | 7.81                        | 7.9                           |
| Fibra dietética (%) | ND                              | 56.8                              | ND                          | 44                            |
| Grasa (%)           | 1.09-1.38                       | 0.7                               | 1.23                        | 4.4                           |
| Proteínas (%)       | 18.54-19.69                     | 6.3                               | 18.91                       | 15.6                          |
| Carbohidratos (%)   | 70.85-72.82                     | 11.3                              | 72.05                       | ND                            |

**ND: No determinada**

2.6. Industria del chocolate en España.

El chocolate, de origen azteca, llegó a España en el siglo XVI y se extendió por medio de órdenes religiosas ya que, en sus comienzos, era un alimento de lujo para clérigos y clases sociales altas.

Teniendo en cuenta los últimos datos disponibles de Produlce (Asociación Española del Dulce), la producción del sector del cacao y el chocolate en España cayó ligeramente en 2016, un 0.9%. A pesar de esto, el mercado nacional español de productos derivados del cacao se incrementó (0,7%). (WEB 7).

Al comparar la producción española, de chocolate y derivados, con la de otros países, España se encuentra por encima de Bélgica, Austria o Dinamarca, por debajo de Italia o Francia y muy por debajo de Alemania y Reino Unido.

En la Figura 17, se puede observar los datos en volumen (toneladas métricas) de la industria del chocolate en España en el año 2017.

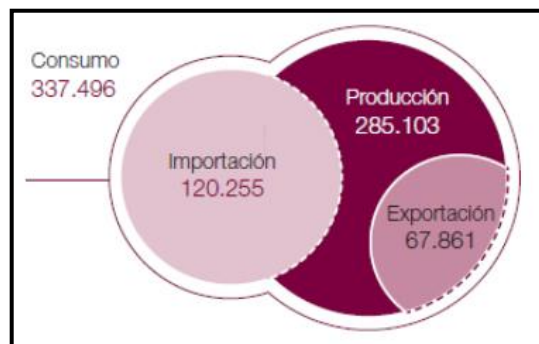


Figura 17. Datos en volumen (t<sub>m</sub>) del sector del chocolate en España en el año 2017. Fuente: WEB8

En la Figura 18, se muestran los porcentajes por tipo de producto derivado del cacao consumido en España en el año 2017.

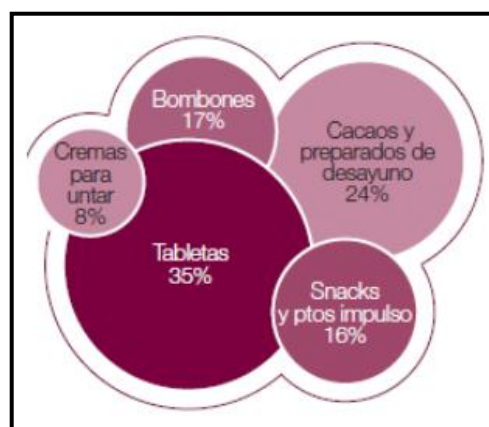
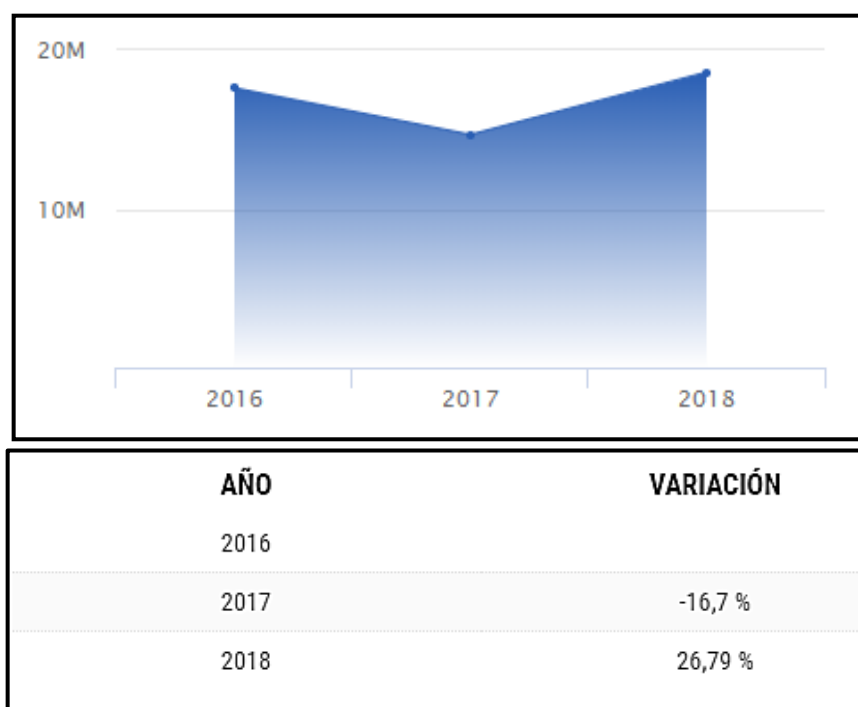


Figura 18. Tipos de productos derivados del cacao (%). Fuente: WEB8

### 2.7. Industria del chocolate en Asturias

Con la llegada del chocolate a España, concretamente en Asturias, se comenzó a elaborar artesanalmente “a brazo” o “a la piedra” y no es hasta 1853 cuando comienza en Asturias su fabricación industrial en “La Perla Americana”, de Oviedo. A principios del siglo XX había 70 fábricas y en los años treinta llegan hasta 100. Este número se mantiene hasta la década de los sesenta en la que se inicia el declive de la industria chocolatera asturiana, quedando en la actualidad solamente una fábrica en Meres (Siero) (WEB 9).

Haciendo referencia a la industria que se encuentra en la actualidad en Asturias, esta se encuentra en Meres (Siero). Su nombre es Chocolates del Norte S.A., perteneciendo al grupo de chocolates Lacasa. Esta industria se creó en el año 1984 con el objeto social de la fabricación de productos derivados del cacao (productos de chocolate). En la Figura 19, se detalla la evolución de las ventas en la industria asturiana Chocolates del Norte S.A. desde 2016 hasta 2018, siendo la última facturación registrada de entre 6 y 30 millones de euros. Teniendo en cuenta que la cascarilla de cacao constituye casi el 80% de la semilla de cacao, este es el residuo generado en mayor cantidad en esta industria (Vriesman, 2012).



**Figura 19.** Evolución de ventas en Chocolates del Norte S.A. Fuente: WEB10.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este proyecto, se ha empleado como material de partida la cascarilla de cacao, residuo de la industria chocolatera. Esta cascarilla fue suministrada por la industria asturiana Chocolates del Norte S.A. (grupo Lacasa).

En todos los experimentos, tanto los ensayos como las medidas, fueron llevados a cabo por triplicado. A continuación, se detallan los materiales, métodos y análisis empleados en este trabajo.

#### 3.1. Determinación de azúcares solubles en el material de partida

El primer paso es determinar la cantidad de azúcares totales y reductores solubles presentes en la muestra sin tratar. Para ello, se hizo una mezcla de cascarilla de cacao con agua destilada al 15% (p/v) en botellas Pyrex de 250 mL. Concretamente, se mezclaron 15 g de cascarilla con 100 mL de agua destilada. Se dejó reposando la mezcla durante una hora, los sólidos se retiraron con ayuda de un colador y el líquido se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min en una centrífuga (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific) (Figura 20). Una vez que la muestra ha sido centrifugada, se filtra empleando papel de filtro de  $\sim 20\mu\text{m}$  para eliminar los posibles sólidos suspendidos. Finalmente, la muestra final obtenida se mantuvo congelada hasta el momento del análisis de carbohidratos, tanto totales como reductores.



**Figura 20.** Centrífuga (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific).

### 3.2. Tratamientos de hidrólisis

Previamente al proceso de fermentación, se tiene que hacer un pretratamiento del sustrato. En este proyecto, se llevaron a cabo distintos tratamientos de hidrólisis, con el objetivo de determinar cuál resulta más adecuado, es decir, con qué tratamiento se consigue extraer más cantidad de azúcares reductores para su posterior utilización en la fase de fermentación.

#### 3.2.1. Hidrólisis hidrotérmica

Se hicieron cuatro tipos de hidrólisis hidrotérmicas a distintos tiempos, pero con la misma temperatura. Para estas cuatro hidrólisis se utilizó un autoclave (AES 75, Raypa) a temperatura constante y con una presión de 2 atm.

En primer lugar, se homogeneizó la cascarilla de cacao en una relación 15% p/v con agua destilada en una botella Pyrex de 250 mL. Las botellas se cerraron dejando cierta holgura en el tapón y se introdujeron en el autoclave a 135°C durante 5, 10, 20 y 40 minutos (cuatro experimentos diferentes por triplicado).

Al sacar del autoclave se dejan enfriar las botellas y una vez atemperadas, se separa la fracción líquida de la sólida con la ayuda de un colador (la fracción sólida es desechada). La parte líquida se centrifuga en la centrifuga, mencionada anteriormente, a 10000 rpm durante 15 min. El sobrenadante resultante se filtró con papel de filtro de ~ 20µm. En el volumen de muestra filtrado se ajustó el pH (Basic 20+, Crison Instruments) entre 6-7 con NaOH 5M y 10M y con HCl 10N (Sigma-Aldrich). La muestra final obtenida se conservó congelada hasta el momento de los análisis.



**Figura 21.** pH-metro (Basic 20+, Crison Instruments)

### 3.2.2. Hidrólisis ácido-térmica

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida se utilizó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sigma-Aldrich) al 5% en relación 15% p/v, es decir, 15 g de material de partida por cada 100 mL de disolución ácida. Las muestras se prepararon en botellas Pyrex de 250 mL y se introdujeron en el autoclave para el tratamiento a  $135^\circ\text{C}$  durante 5, 10 y 40 min (cuatro experimentos diferentes por triplicado).

Además, se llevaron a cabo tres hidrolisis ácido térmicas con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%, 15% y 20% en relación 15% p/v. Las muestras se vertieron en botellas Pyrex de 250 mL y se introdujeron en el autoclave para un tratamiento  $135^\circ\text{C}$  durante 5 min.

A partir de este punto se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el caso de los tratamientos hidrotérmicos.

### 3.2.3. Hidrólisis básica o alcalino-térmica

Para llevar a cabo la hidrólisis básico- térmica se utilizó NaOH (Sigma-Aldrich) al 5% en relación 15% p/v, es decir, 15 g de cascarilla de cacao por cada 100 mL de disolución básica. Las muestras se prepararon en botellas Pyrex de 250 mL y se introdujo en el autoclave para el tratamiento a  $135^\circ\text{C}$  durante 5 y 40 min (cuatro experimentos diferentes por triplicado).

A partir de este punto se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el caso de los tratamientos hidrotérmicos.

### 3.3. Tratamiento para la extracción de azúcares potenciales

Siguiendo el método descrito por Lenihan et al. (2011), se llevó a cabo un tratamiento para la extracción de azúcares potenciales tanto reductores como totales. En este método las muestras se someten a condiciones de hidrólisis muy severas. Este ensayo tiene como objetivo comparar el azúcar final extraído tras los tratamientos de hidrólisis (hidrotérmica, ácido-térmica, alcalino-térmica) con la cantidad total de azúcar presente en la cascarilla de cacao que se podría extraer.

Los diferentes pasos para realizar este método son:

- 1) Pesar 0.3 gramos, aproximadamente, de cascarilla de cacao.
- 2) Introducir la muestra en un tubo de ensayo de 12 mL de capacidad.
- 3) Añadir 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sigma-Aldrich) diluido al 85%.
- 4) Matener el tubo cerrado en un baño a  $30^\circ\text{C}$ , durante 2 horas, agitando manualmente cada 10 min.



- 5) Verter la disolución en una botella Pyrex de 250 mL y añadir agua destilada hasta un peso final de la muestra de 89.11 g.
- 6) Autoclavar la botella con la mezcla a 121°C durante 1 h a una presión de 1 bar.
- 7) Dejar enfriar la muestra y filtrar con papel de filtro de  $\sim 20\mu\text{m}$ .
- 8) El pH se ajusta entre 6 y 7 con NaOH 5M y 10M y con HCl 10N.
- 9) La muestra final obtenida se conservó congelada hasta el momento del análisis de los azúcares totales y reductores.

En la Figura 22, se pueden observar las muestras para la extracción de azúcares potenciales antes y después de ser autoclavadas.



**Figura 22.** Muestras de cascarilla de cacao en la extracción de azúcares potenciales, antes de autoclavar (izquierda), y después (derecha).

### 3.4. Métodos para la cuantificación de azúcares

Para la cuantificación de azúcares, tanto totales como reductores, se utilizaron métodos espectrofotométricos. Como se mencionó anteriormente, los tratamientos y las medidas se hacen por triplicado, por lo que en el apartado de Resultados y Discusión se muestra el valor medio de la concentración de azúcares  $\pm$  la desviación estándar.

Los métodos analíticos utilizados fueron: el método del Fenol-Sulfúrico para azúcares totales y el método del reactivo DNS para azúcares reductores. En la Figura 23, se pueden observar los equipos utilizados para realizar las medidas espectrofotométricas.



**Figura 23.** Espectrofotómetro Hach DR/2400 para azúcares totales (izquierda) y espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1300/1500 para azúcares reductores (derecha).

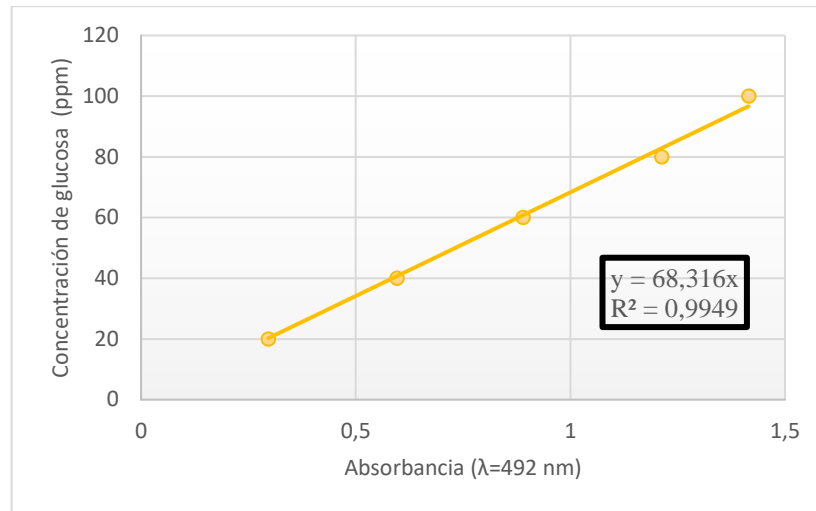
#### 3.4.1. Método Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales

La evaluación de carbohidratos totales presentes en la muestra se llevó a cabo por medio de una adaptación del método fenol sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956).

Los diferentes pasos del método se describen a continuación:

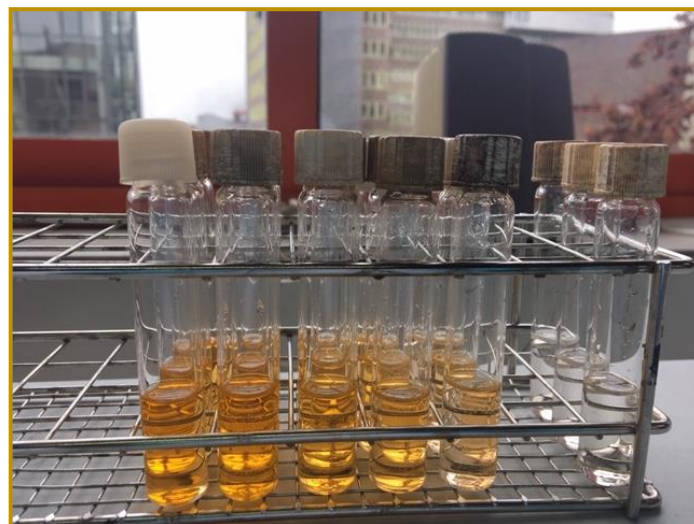
- 1) 1 mL de muestra al que se le añade 0.5 mL de fenol (Sigma-Aldrich) al 5%.
- 2) Se adicionan 2.5 mL de  $H_2SO_4$  al 96% (Sigma-Aldrich) y se agita la mezcla rápidamente.
- 3) Se deja enfriar la muestra, ya que es una reacción exotérmica.
- 4) Una vez que estén a temperatura ambiente, las muestras se miden en el espectrofotómetro (Analytik Jena SPEKOL 1300/1500) a una longitud de onda de 492 nm.

Con la finalidad de poder determinar la concentración de azúcares totales se debe realizar una recta de calibrado (Figura 24), representándose la absorbancia en función de la concentración. Esta curva se hace empleando como patrón glucosa (Panreac) a diferentes concentraciones. Al blanco se le añade agua destilada en lugar de muestra (Figura 25). En la curva de calibrado el análisis se hace también por triplicado.



**Figura 24.** Recta de calibrado para la determinación de carbohidratos totales.

En la Figura 25, se puede observar el cambio en el color a medida que va aumentando la concentración de glucosa (de derecha a izquierda).



**Figura 25.** Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los carbohidratos totales. De derecha a izquierda: blanco, 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, 100ppm.

El cálculo de la concentración de azúcares a partir de los valores de absorbancia, se detalla en el apartado 4.3.

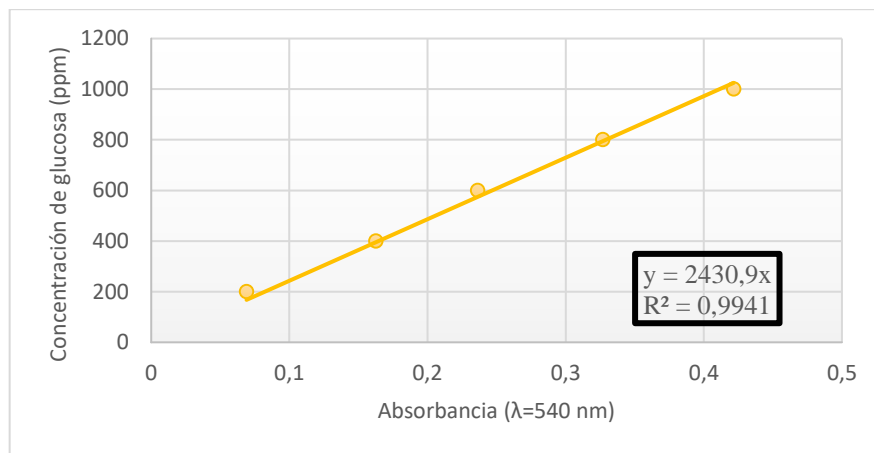
#### 3.4.2. Método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la cuantificación de azúcares reductores.

La evaluación de carbohidratos reductores presentes en la muestra se llevó a cabo por medio de la metodología descrita por Bello Gil et al. (2006).

Los diferentes pasos del método se detallan a continuación:

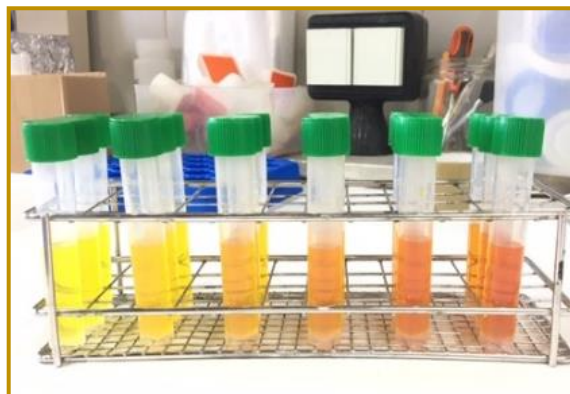
- 1) Se mezclaron 0.5 mL de muestra con 0.5 mL del reactivo DNS (Sigma-Aldrich) en tubos de ensayo de 12 mL.
- 2) La mezcla se calentó a 95°C en un baño durante 5 minutos.
- 3) Al sacar las muestras del baño, se introdujeron en hielo durante 5 minutos.
- 4) Después de sacar del hielo, se añadieron 5 mL de agua destilada a cada tubo de muestra.
- 5) Se agitaron y se midieron en un espectrofotómetro (Hach DR/2400) a una longitud de onda de 540 nm.

Al igual que con los carbohidratos totales, para determinar la concentración de carbohidratos reductores es necesario hacer una recta de calibrado empleando patrones de glucosa a diferentes concentraciones (Figura 26). Al blanco se le añaden 0.5 mL de agua destilada.



**Figura 26.** Recta de calibrado para la determinación de carbohidratos reductores.

En la Figura 27, se puede observar el cambio en el color a medida que va aumentando la concentración de glucosa (de izquierda a derecha).



**Figura 27.** Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los carbohidratos reductores. De izquierda a derecha: blanco, 200ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm, 1000ppm.

Como en el caso anterior, la concentración de carbohidratos se calcula a partir de la fórmula explicada detalladamente en el apartado 4.3.

#### → Preparación del reactivo DNS

Para preparar 100 mL de reactivo DNS, se disolvieron 1.6 g de NaOH (Panreac), 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (Sigma-Aldrich) y 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich) en agua destilada. El reactivo se dejó agitando entre 12 y 15 h envuelto en papel de aluminio ya que es un reactivo fotosensible. Una vez preparado, se conservó en nevera utilizándolo en un plazo máximo de 30 días.

### 3.5. Ecuación para el cálculo de carbohidratos

Para poder comparar las diferentes muestras analizadas, es necesario corregir los valores de azúcares totales y reductores obtenidos a fin de expresarlos por cada 100 gramos de residuo seco, para ello se aplica la siguiente ecuación:

$$\frac{g \text{ azúcar}}{100 g \text{ residuo seco}} = \frac{Abs * R * F}{1000} * \frac{1 \text{ litro}}{1000} * \frac{Vf}{Po} * \frac{100 g \text{ de residuo fresco}}{X g \text{ de residuo seco}} * 100$$

A continuación, se describe cada término de la ecuación:

- Abs (absorbancia) → absorbancia medida en cada muestra.
- R → valor de la recta de calibrado, en la cual en el eje X se representa la absorbancia y en el eje Y la concentración de glucosa en ppm.
- F → factor de dilución empleado en cada caso
- Vf → volumen final de muestra que se congela.
- Po → peso inicial de material de partida (aproximadamente 15 g en todos los tratamientos, excepto en el de azúcares potenciales que se pesaba 0.3 g.).
- X → porcentaje de residuo seco de la cascarilla de cacao. Este porcentaje se calcula: 100% - porcentaje de humedad.

### 3.6. Determinación del contenido en humedad

Para llevar a cabo el análisis del contenido en humedad de la cascarilla de cacao se prepararon un total de tres cápsulas con arena de mar lavada (Panreac) para realizar la determinación por triplicado. Las cápsulas con la arena de mar lavada se introdujeron en una estufa a 105°C durante 20 minutos aproximadamente. Pasado este tiempo, se pesaron y se procedió a triturar en cada una de las cápsulas 2 gramos del material residual de cascarilla de cacao (peso inicial). Las cápsulas con la arena de mar y el residuo se volvieron a meter en la estufa a 105°C durante 12-15 horas. Para enfriar las cápsulas se metieron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Una vez atemperadas, se pesaron nuevamente (peso final).

Para calcular el porcentaje de humedad, se empleó la siguiente ecuación:

$$H = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

### 3.7. Determinación del contenido en inhibidores

Tratamientos a elevada presión y temperatura en sustratos ricos en carbohidratos complejos pueden conllevar a la formación de compuestos inhibidores, tal y como se mencionó anteriormente. En los procesos de hidrólisis, los inhibidores más destacados son el ácido acético, el hidroximetilfurfural (HMF) y el furfural (Hamelinck et al., 2005).

Estos compuestos se analizaron tras los diferentes tratamientos de hidrólisis hidrotérmicas e hidrólisis ácido-térmicas. Las hidrólisis básicas tuvieron peores resultados con respecto al resto de experimentos en cuanto a la obtención de azúcares reductores, por lo que no se llevó a cabo el análisis de inhibidores.

El objetivo de este análisis es conocer su concentración a fin de determinar su posible influencia en el posterior proceso fermentativo. Previamente al análisis de compuestos inhibidores las muestras se centrifugaron a 14680 rpm durante 10 minutos, filtrándose posteriormente el sobrenadante a través de filtros de 0.45 µm.

Para el estudio de inhibidores se siguió la metodología modificada a partir de la descrita por Díaz et al. (2017). Estos compuestos se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), utilizando un cromatógrafo Agilent 1200 (Figura 28).



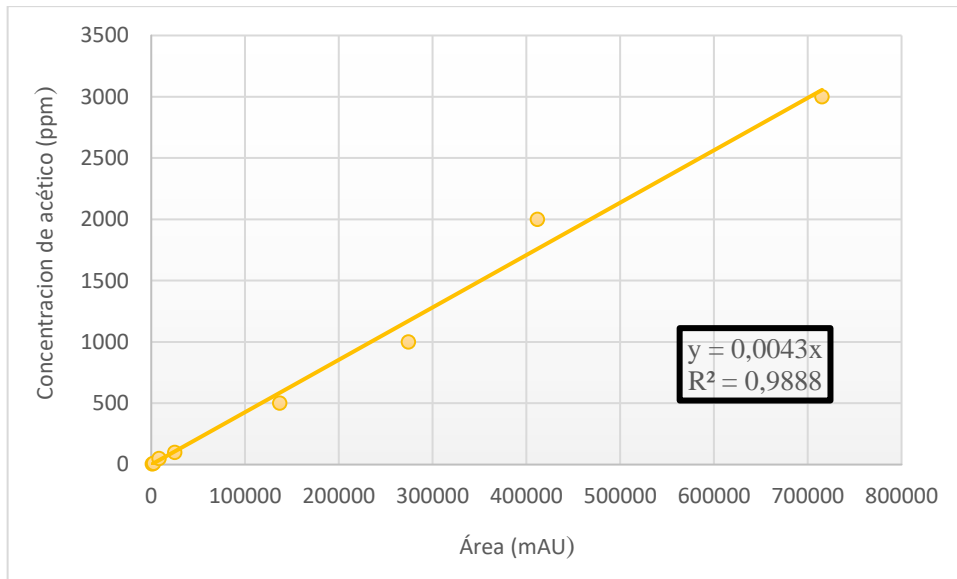
**Figura 28.** Equipo HPLC Agilent 1200 empleado en el proyecto.

Para estimar la concentración de ácido acético se utilizó una columna Coregel ION 300 (Concise Separations) empleando a un detector de índice de refracción (RID). La fase móvil utilizada en este caso es  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.450 mM y pH 3.1) (Sigma-Aldrich), la temperatura de la columna fue constante a  $75^\circ\text{C}$  y el flujo de 0.3 mL/min. Por otro lado, para cuantificar el contenido de furfural e hidroximetilfurfural se empleó una columna Gemini-NX  $5\ \mu\text{m}$  C18 110A (Phenomenex) acoplada a un detector DAD. La fase móvil empleada en este caso fue metanol/agua (10:90), la temperatura de la columna  $30^\circ\text{C}$  y el flujo de 1 mL/min. La detección final de UV se fijó a 280 nm, ya que era la señal recibida más alta.

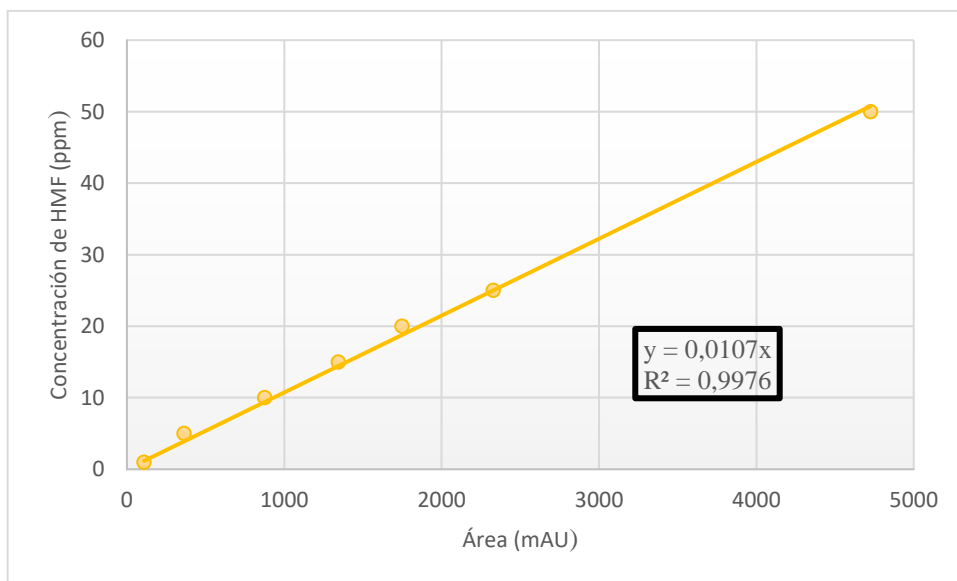
A la hora de la obtención de datos se utilizó el software ChemStation (Agilent). Las sustancias inhibidoras se cuantificaron empleando como patrones de referencia estándares analíticos de ácido acético, HMF y furfural (Sigma-Aldrich).

El cálculo del hidroximetilfurfural y el ácido acético se llevó a cabo mediante una recta de calibrado (Figuras 29 y 30). En dichas rectas se representa la concentración del inhibidor (ppm) en el eje de ordenadas y el área del pico (mAU) en el eje de abscisas.

Por otro lado, en el caso del furfural no fue posible determinar con exactitud su concentración en las muestras porque se solapaba con otros compuestos presentes en los hidrolizados, por tanto, se hizo un cálculo aproximado a fin de obtener un valor límite de concentración de furfural.



**Figura 29.** Recta de calibrado para la determinación del contenido en ácido acético.



**Figura 30.** Recta de calibrado para la determinación del contenido en HMF.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de los materiales de partida

#### 4.1.1. Análisis del contenido en humedad

El residuo empleado como material de partida para llevar a cabo los diferentes ensayos de este proyecto fue la cascarilla de cacao, procedente del descascarillado del fruto de cacao.

El objetivo de calcular el porcentaje de humedad, es determinar la cantidad de extracto seco de dicho residuo para poder hallar la concentración de azúcares de la muestra. El método que se siguió para determinar la humedad, así como el cálculo, se describen en el apartado de Materiales y Métodos.

En la siguiente tabla, se puede observar los datos obtenidos en el análisis de la humedad de la cascarilla de cacao.

**Tabla 2.** Humedad de la cascarilla de cacao expresada en porcentaje con su desviación típica

| Humedad por triplicado (%) | Humedad media total (%) |
|----------------------------|-------------------------|
| 0.40                       | 0.46 ± 0.05             |
| 0.47                       |                         |
| 0.49                       |                         |

La cascarilla de cacao es un material seco, por lo que contiene un elevado porcentaje de extracto seco y un bajo contenido en humedad. Según los datos encontrados en la bibliografía (Tabla 1), la humedad de la cascarilla de cacao oscila entre los valores 3.46 y 6.7. El valor de humedad obtenido en este trabajo es inferior, pero hay que tener en cuenta de que la cascarilla utilizada como material de partida procede de un proceso industrial en el que el cacao ha sido tostado previamente al descascarillado con aire, lo que hace que el agua contenida en la cascarilla se evapore.

Con el dato de humedad de la Tabla 2, se puede calcular el porcentaje de extracto seco total. Restando el porcentaje de humedad al 100%, se obtiene un extracto seco de 99.54%. Este número corresponde al término X de la ecuación del cálculo de azúcares detallada en el apartado 4.3.

#### 4.1.2. Azúcares totales y reductores solubles

Como se comentó anteriormente, en general se considera que los azúcares reductores (monosacáridos, maltosa y lactosa) se corresponden con los fermentables. Por tanto, sabiendo el porcentaje de azúcares reductores se puede evaluar, de manera aproximada, la cantidad de azúcares directamente fermentables para usar directamente en diferentes procesos fermentativos. Sin embargo, los azúcares totales incluyen todos los azúcares, tanto simples como de cadena larga (celulosa, hemicelulosa...). Estos últimos necesitan un pretratamiento de hidrólisis para convertirse en azúcares fermentables. Para llevar a cabo este ensayo, la cascarilla de cacao se mezcló con agua en una relación 15% (p/v) y se procedió a analizar los carbohidratos.

En la siguiente tabla, se registran los valores de azúcares totales y reductores de las muestras no sometidas a hidrólisis. Tales valores se expresan en gramos de azúcar por 100 gramos de residuo seco.

**Tabla 3.** Azúcares solubles sin tratamiento de hidrólisis expresados en g azúcar por 100 g de residuo seco

|                                    | <b>Azúcares totales<br/>solubles</b> | <b>Azúcares<br/>reductores solubles</b> | <b>Relación<br/>reductores/totales (%)</b> |
|------------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| Media $\pm$ desviación<br>estándar | 2.50 $\pm$ 0.09                      | 0.81 $\pm$ 0.47                         | 0.32                                       |

Los datos de carbohidratos totales presentes en la cascarilla de cacao varían entre un 11 y un 73%, dependiendo de los autores (ver Tabla 1). Comparando estos datos con el resultado del ensayo (2.50 g azúcar/100 g residuo seco), se observa que es un valor muy alejado. Este resultado es lógico, ya que no se ha llevado a cabo un tratamiento que conlleve su solubilización e hidrólisis.

#### 4.1.3. Azúcares potenciales

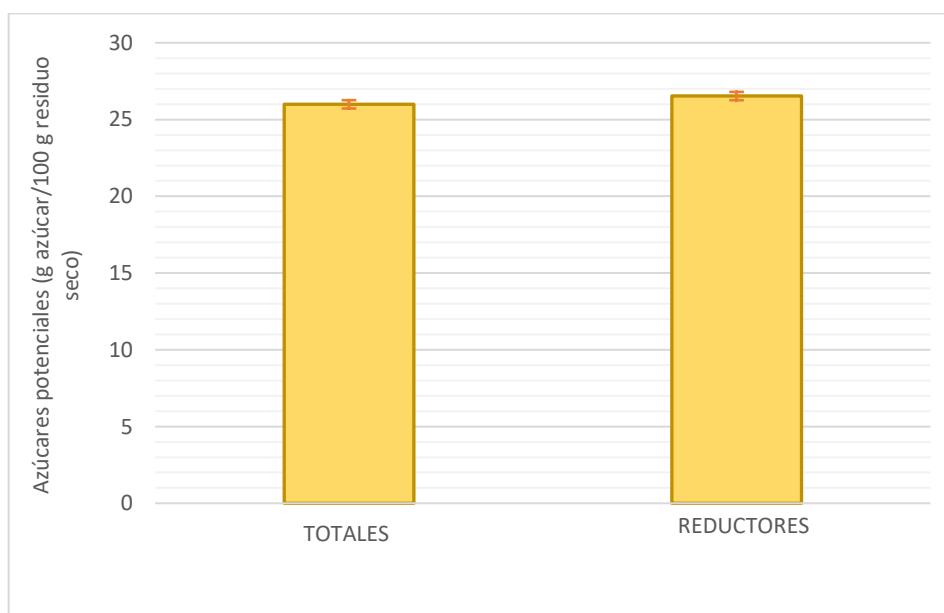
Para determinar la cantidad máxima de azúcares fermentables que se podrían obtener de una muestra se midieron los azúcares potenciales. Esto se hizo con la finalidad de poder comparar los azúcares extraídos en cada tratamiento, tanto totales como reductores, con el máximo que se podría extraer. Para medir azúcares potenciales, totales y reductores, se utilizaron los métodos descritos en los Apartados 4.1. y 4.2., respectivamente.

En la Tabla 4, se muestran los datos obtenidos de azúcares potenciales en el residuo de la cascarilla de cacao. Los resultados se expresan en gramos de azúcar por cada 100 gramos de residuo seco.

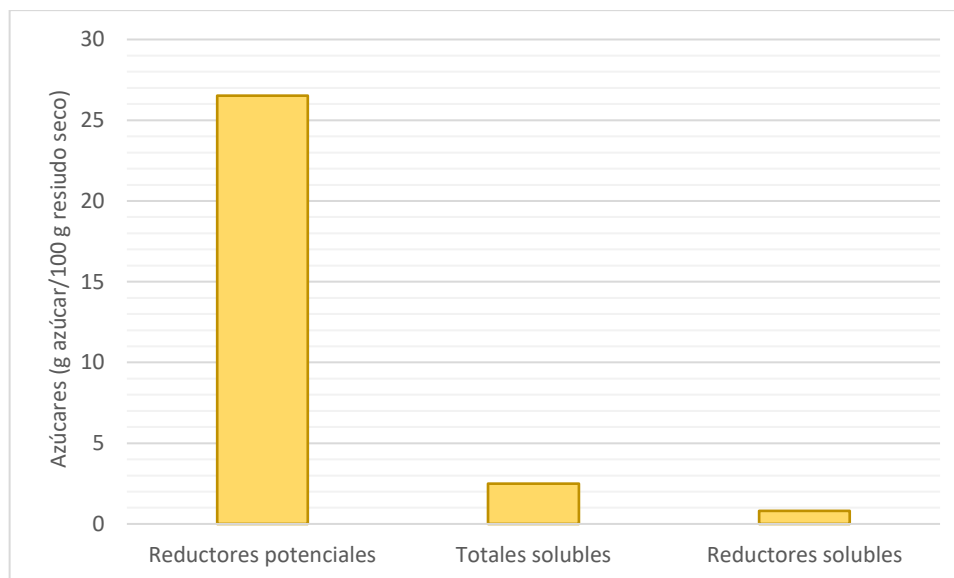
**Tabla 4.** Azúcares potenciales expresados en g azúcar por 100 g de residuo seco.

|                                 | <b>Azúcares potenciales totales</b> | <b>Azúcares potenciales reductores</b> |
|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| Media $\pm$ desviación estándar | 25.99 $\pm$ 13.18                   | 26.54 $\pm$ 1.79                       |

Como se puede observar en la Figura 31, se obtiene una cantidad de carbohidratos potenciales reductores similar a la de carbohidratos potenciales totales, lo que indica que el método empleado para analizar azúcares potenciales consigue transformar en azúcares reductores todos los azúcares extraídos. La cantidad de azúcares que se consigue extraer con el método empleado para medir azúcares potenciales es más del doble del contenido en carbohidratos indicado por Villamizar & López (2016) para la cascarilla de cacao, pero dista mucho del indicado por otros autores (ver Tabla 1).

**Figura 31.** Azúcares potenciales de la cascarilla de cacao expresados en g azúcar/100 g residuo seco.

En la Figura 32, se observa la cantidad de azúcares potenciales reductores y la de azúcares totales y reductores de la muestra sin tratamiento de hidrólisis en g de azúcar/100 g residuo seco.



**Figura 32.** Cantidad de azúcares reductores potenciales, totales solubles y reductores solubles. Estos últimos obtenidos a partir del residuo sin tratamiento de hidrólisis.

Se puede observar que la cantidad de azúcares reductores extraídos de la muestra sin tratamiento de hidrólisis es menor que la de azúcares potenciales reductores. Esto demuestra que no podemos extraer la cantidad máxima de azúcares reductores presentes en la cascarilla de cacao sin un previo tratamiento de hidrólisis.

## 4.2. Azúcares totales y reductores extraídos tras los tratamientos de hidrólisis

### 4.2.1. Hidrólisis hidrotérmica

La hidrólisis hidrotérmica, básicamente, consistió en mezclar la cascarilla de cacao con agua y someterla a una temperatura de 135°C en autoclave, ya que a esta temperatura se conseguían buenos resultados en trabajos previos con residuos distintos a la cascarilla (Hernández, 2017), a diferentes tiempos, tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. Este tratamiento tiene como fin degradar los hidratos de carbono complejos a hidratos de carbonos más simples.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras los cuatro tratamientos hidrotérmicos a distintos tiempos.

En la Tabla 5, se muestran los datos obtenidos en las distintas hidrólisis hidrotérmicas llevadas a cabo a 135°C durante distintos tiempos. Estos datos corresponden al análisis de azúcares totales y reductores de los caldos obtenidos a partir de la cascarilla de cacao, las desviaciones estándar y el

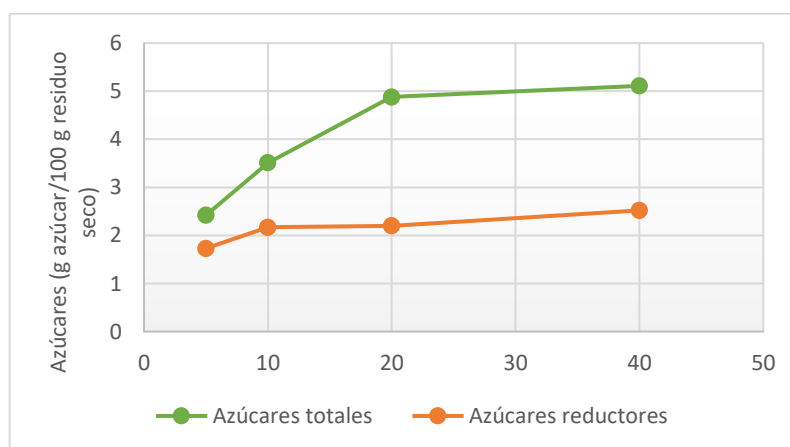
porcentaje de la relación entre azúcares totales y reductores. Dichos números son los valores medios de los triplicados de cada ensayo con sus desviaciones estándar.

**Tabla 5.** Azúcares totales y reductores obtenidos mediante las hidrólisis hidrotérmicas realizadas a 135°C y distintos tiempos expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales.

| Tratamiento  | Azúcares totales (g azúcar/100 g residuo seco) | Azúcares reductores (g azúcar/100 g residuo seco) | Relación azúcares reductores/totales (%). |
|--------------|--|---|---|
| 135°C 5 min  | 2.42 ± 0.29                                    | 1.73 ± 1.00                                       | 71.54                                     |
| 135°C 10 min | 3.54 ± 0.17                                    | 2.17 ± 0.01                                       | 61.40                                     |
| 135°C 20 min | 4.88 ± 0.007                                   | 2.20 ± 0.25                                       | 45.14                                     |
| 135°C 40 min | 5.10 ± 0.04                                    | 2.52 ± 0.14                                       | 49.48                                     |

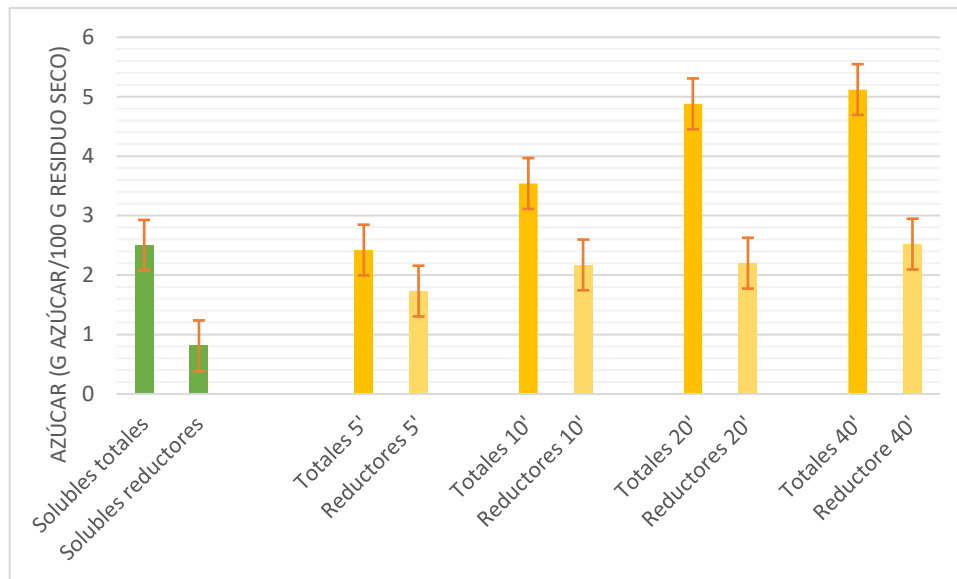
Analizando los datos de la tabla, se concluye que a medida que se aumenta el tiempo de tratamiento aumenta la cantidad de azúcares extraídos, tanto reductores como totales. La hidrólisis hidrotérmica con mayor extracción de azúcares es la de mayor tiempo (40 min) y la relación entre reductores y totales es mayor en el ensayo de menor tiempo (71.5%).

En el tratamiento de 40 min la diferencia de azúcares totales con respecto al ensayo de 20 min es mínima, lo cual se puede observar con claridad en la Figura 33. En lo que respecta a los azúcares reductores se observa que la diferencia entre tratar la muestra durante 10 min o 40 min tan solo consigue incrementar la cantidad de azúcares reductores extraídos en un 16%.



**Figura 33.** Cantidad de azúcares extraídos mediante tratamiento hidrotérmico a 135°C en función del tiempo de tratamiento.

En la Figura 34, se muestra la cantidad de azúcares solubles (extraídos de la muestra sin tratamiento) y la de azúcares totales y reductores extraídos de la muestra tras las hidrólisis hidrotérmicas.



**Figura 34.** Azúcares solubles extraídos de la muestra sin tratamiento (en verde), azúcares totales y reductores obtenidos a partir del residuo tras los tratamientos de hidrólisis hidrotérmica a 135°C (en amarillo).

Al comparar la cantidad de azúcares obtenidos tras las hidrólisis con los azúcares solubilizados sin tratamiento (Figura 34) queda claro que la hidrólisis hidrotérmica permite extraer una mayor cantidad de carbohidratos tanto totales como reductores con respecto a los datos obtenidos de la muestra sin tratamiento de hidrólisis previo. Esto es un aspecto positivo, ya que en este proyecto se quiere buscar el tratamiento a partir del cual se consiga extraer una mayor cantidad de azúcares para el posterior proceso de fermentación. No obstante, la cantidad de azúcares reductores obtenida es menor a la de azúcares totales y muy inferior a la de azúcares reductores potenciales (26 g/100 g residuo seco), con lo que el tratamiento de hidrólisis todavía puede ser mejorado.

En un estudio llevado a cabo por Hernández (2017), se hizo un tratamiento de hidrólisis hidrotérmica a 135°C utilizando como sustrato residuos de frutas como la cáscara de plátano, la cáscara de naranja y la pulpa de plátano. Para la cáscara de naranja y la cáscara de plátano dicho ensayo no fue muy eficaz, mientras que para la pulpa de plátano se obtuvo una eficacia de extracción del 90%.

## 4.2.2. Hidrólisis ácido-térmicas.

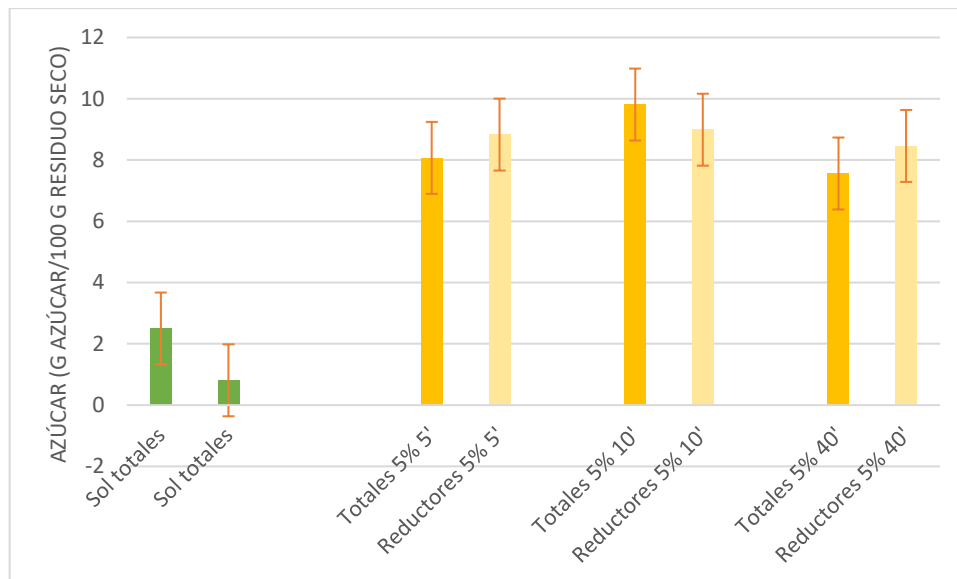
Otra forma de aumentar la eficacia en los procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos, es adicionar ácido (Díaz, 2017). Así, se realizaron hidrólisis ácido térmicas mezclando la cascarilla de cacao con una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) a cuatro concentraciones diferentes e introduciendo la mezcla en autoclave a una temperatura de 135°C durante tiempos diferentes, (descrito en el apartado de Materiales y Métodos).

En la Tabla 6, se muestran los resultados de azúcares obtenidos tras las hidrólisis ácido térmica con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%, a 135°C y a tres tiempos diferentes.

**Tabla 6.** Datos obtenidos tras las hidrólisis ácido térmicas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%. Contenido de azúcares totales y reductores expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales.

| Tratamiento      | Azúcares totales (g azúcar/100 g residuo seco) | Azúcares reductores (g azúcar/100 g residuo seco) | Relación reductores/totales (%) |
|------------------|--|---|---------------------------------|
| 5%, 135°C 5 min  | 8.07 ± 0.01                                    | 8.83 ± 0.19                                       | 109.4                           |
| 5%, 135°C 10 min | 9.81 ± 0.16                                    | 8.99 ± 0.65                                       | 91.64                           |
| 5%, 135°C 40 min | 7.56 ± 0.31                                    | 8.46 ± 0.12                                       | 111.9                           |

Como se puede ver, las diferencias entre los tres tiempos no son muy significativas, obteniéndose los mejores resultados a los 10 min de tratamiento. Comparando con los resultados obtenidos tras las hidrólisis hidrotérmicas, las hidrólisis ácido térmicas consiguen extraer una cantidad de azúcares reductores considerablemente superior (unas 4 veces más), por lo que serían tratamientos más adecuados para la aplicación del sustrato en procesos fermentativos. Otro aspecto a tener en cuenta al analizar los azúcares de dichas hidrólisis, es que todos los carbohidratos extraídos son carbohidratos reductores, ya que ambos valores son muy similares. En la Figura 35, se puede observar la cantidad de azúcares de la muestra sin tratamiento y la de azúcares totales y reductores de la muestra tras las hidrólisis ácido térmicas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%.



**Figura 35.** Azúcares solubles extraídos de la muestra sin tratamiento (en verde), azúcares totales y reductores obtenidos a partir del residuo tras los tratamientos de hidrólisis ácido térmicas con  $H_2SO_4$  al 5% (en amarillo)

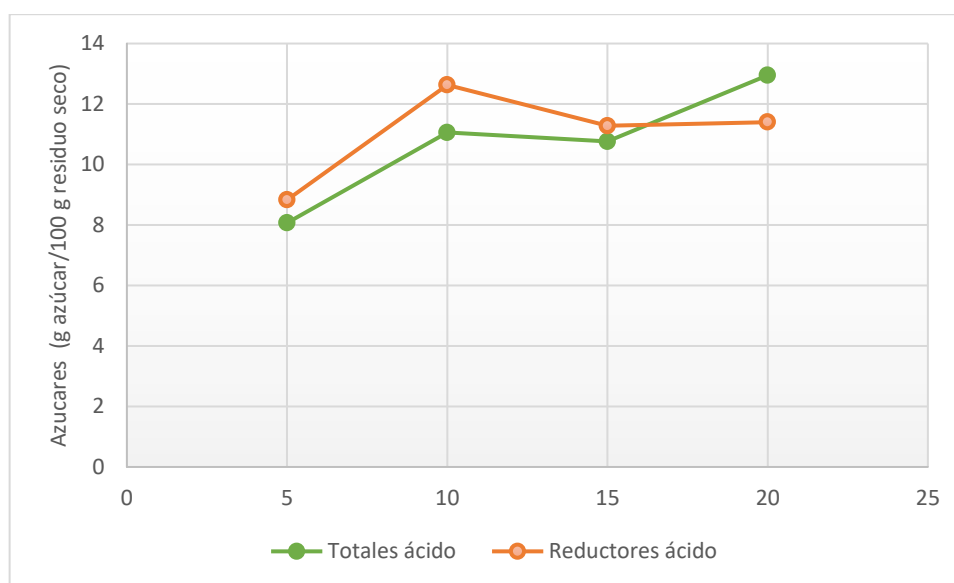
En vista de los buenos resultados obtenidos con las hidrólisis ácido-térmicas, se ha planteado incrementar la concentración de ácido con el fin de comprobar la posibilidad de aumentar la eficacia en el proceso de extracción de azúcares. En la Tabla 7, se registran los datos obtenidos tras las hidrólisis ácido- térmicas con  $H_2SO_4$  al 10%, 15% y 20%, a una temperatura de 135°C durante 5 min. Como se ve la cantidad de azúcares reductores extraídos se consigue incrementar en más de un 30% con respecto a la concentración de ácido del 5%. Las condiciones con las que más cantidad de carbohidratos reductores se consigue extraer son con  $H_2SO_4$  al 10% y más carbohidratos totales con ácido al 20%, a una temperatura de 135°C durante 5 min. Por tanto, después de tener todos los datos de los carbohidratos extraídos tras las distintas hidrólisis ácido- térmicas, se concluye que en general, a mayor cantidad de ácido se obtiene una mayor cantidad de azúcares totales, pero no de reductores, siendo la concentración óptima de ácido a emplear un 10% (Figura 36).

Hay estudios que demuestran que la combinación de un pretratamiento térmico y su posterior hidrólisis enzimática conlleva a un aumento de la extracción de azúcares de la muestra. Este tipo de ensayos conllevaría a un encarecimiento del proyecto (Díaz, 2017).



**Tabla 7.** Azúcares totales y reductores obtenidos tras las hidrólisis ácido-térmicas realizadas con distinta concentración de ácido expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales.

| Tratamiento      | Azúcares totales (g azúcar/100 g residuo seco) | Azúcares reductores (g azúcar/100 g residuo seco) | Relación reductores/totales (%) |
|------------------|--|---|---------------------------------|
| 10%, 135°C 5 min | 11.06 ± 0.52                                   | 12.63 ± 0.37                                      | 114.19                          |
| 15%, 135°C 5 min | 10.76 ± 0.04                                   | 11.28 ± 0.84                                      | 104.83                          |
| 20%, 135°C 5 min | 12.95 ± 0.14                                   | 11.40 ± 0.80                                      | 88.03                           |



**Figura 36.** Cantidad de azúcares extraídos tras las hidrólisis con ácido a distintas concentraciones

#### 4.2.3. Hidrólisis básico-térmicas.

Con el fin de incrementar la eficacia en la extracción de azúcares reductores, se ensayó la adición de una base que incrementara el pH del medio (Sun & Cheng, 2002). Al adicionar agua destilada a la cascarilla, el pH era de 4.87 y al mezclar con un agente ácido o básico el pH varía según se muestra en la Tabla 8. Así, la hidrólisis básica o alcalina se llevó a cabo mezclando cascarilla de cacao con NaOH (Sigma-Aldrich) al 5% en una relación 15% (p/v). La mezcla se introdujo en autoclave a una temperatura de 135°C durante dos tiempos diferentes, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

**Tabla 8.** Valores de pH al adicionar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NaOH

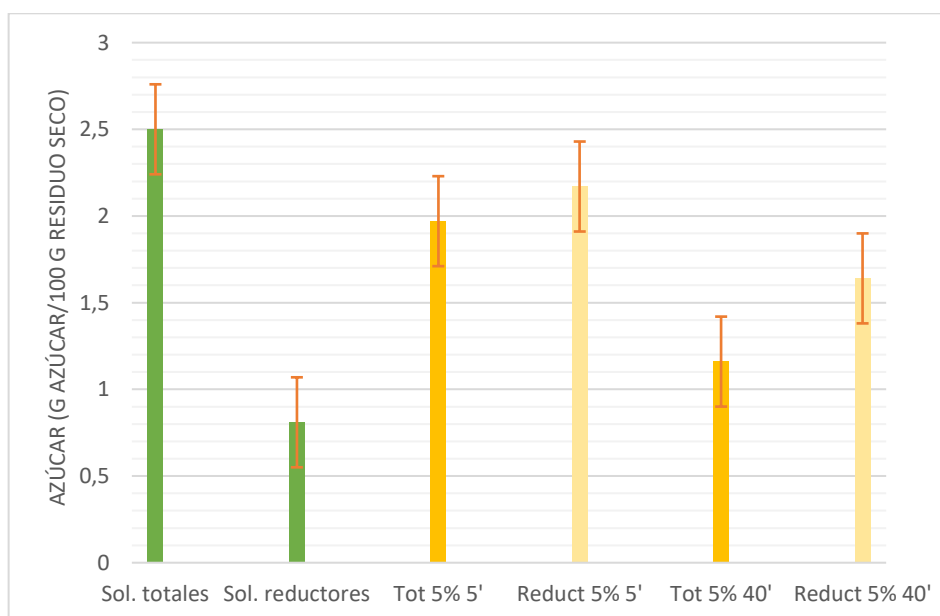
| <b>Tratamiento</b>                          | <b>Valores de pH</b> |
|---|----------------------|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% 5 min  | -0.27 ± 0.02         |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% 10 min | 0.07 ± 0.06          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% 40 min | -0.11 ± 0.10         |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% 5 min | -0.29 ± 0.01         |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 15% 5 min | -0.47 ± 0.02         |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 20% 5 min | -0.4 ± 0.10          |
| NaOH al 5% 5 min                            | 15.35 ± 0.05         |
| NaOH 5% 40 min                              | 14.77 ± 0.14         |

En la Tabla 9, se pueden observar los datos de azúcares obtenidos de los diferentes ensayos de hidrólisis básica. Analizando los resultados de la Tabla 9, se puede ver que al aumentar el tiempo de tratamiento disminuye la cantidad de carbohidratos tanto totales como reductores extraída. Se observa que en el ensayo realizado 5 min la cantidad de carbohidratos reductores y totales es prácticamente igual, mientras que en el ensayo de 40 min la cantidad de carbohidratos reductores medida superó ligeramente a la de carbohidratos totales. Obviamente este resultado no tiene sentido y se achaca a algún tipo de interferencia o artefacto sufrido como consecuencia del tratamiento básico. De hecho, se observó que después de estas hidrólisis, se obtenían volúmenes muy pequeños de caldo, mientras que el sólido separado era una masa gelatinosa que arrastraba gran parte del líquido. Esto tendrá consecuencia en el resultado, ya que al aplicar la ecuación del cálculo de azúcares hay que multiplicar por el volumen final de muestra a congelar. Por tanto, la cantidad de azúcares extraída en el caldo obtenido de estos ensayos fue similar o incluso inferior a la obtenida con las hidrólisis hidrotérmicas.

**Tabla 9.** Azúcares totales y reductores obtenidos tras las hidrólisis básico-térmicas realizadas a 135°C y distintos tiempos expresados en g azúcar/100 g residuo seco y el porcentaje de la relación entre reductores y totales.

| Tratamiento           | Azúcares totales (g azúcar/100 g residuo seco) | Azúcares reductores (g azúcar/100 g residuo seco) | Relación reductores/totales (%) |
|-----------------------|--|---|---------------------------------|
| NaOH 5% 135°C 5 min   | 1.97 ± 0.16                                    | 2.17 ± 0.45                                       | 110.15                          |
| NaOH 5%, 135°C 40 min | 1.16 ± 0.31                                    | 1.64 ± 0.37                                       | 141.37                          |

A continuación, se muestra una figura con la comparación de los azúcares de la muestra sin previo tratamiento de hidrólisis y los de las muestras tras las hidrólisis básico-térmicas.



**Figura 37.** Azúcares solubles extraídos de la muestra sin tratamiento (en verde), azúcares totales y reductores obtenidos a partir del residuo tras los tratamientos de hidrólisis básico-térmicas con NaOH al 5% (en amarillo)

Observando la Figura 37, la cantidad de azúcares totales obtenida tras las hidrólisis básico-térmicas es inferior a los carbohidratos que se consiguen extraer de la muestra sin tratamiento. Por el contrario, los carbohidratos reductores extraídos tras las hidrólisis básicas son ligeramente superiores, lo cual es un punto a favor para nuestro trabajo. No obstante, teniendo en cuenta que los rendimientos de caldo obtenido se reducen considerablemente y que no se logra una mejoría interesante en cuanto al contenido de azúcares extraídos con respecto al tratamiento hidrotérmico sin adición de base, este tratamiento de hidrólisis se descarta.

### 4.3. Análisis de resultados

#### 4.3.1. Sólido solubilizado

Con el fin de cuantificar el residuo sólido que permanece sin solubilizar tras los diferentes tratamientos de hidrólisis, se separaba la fracción líquida de la sólida mediante el empleo de un tamiz con un tamaño de paso de aproximadamente 1 mm. Tras separar el líquido de los sólidos (que luego se desechaban), se procedió a pesar estos últimos para poder así determinar su peso húmedo (g). Las cantidades de sólidos separadas tras cada ensayo de hidrólisis se muestran en la siguiente tabla. Cada resultado corresponde a la media de los triplicados de cada tratamiento.

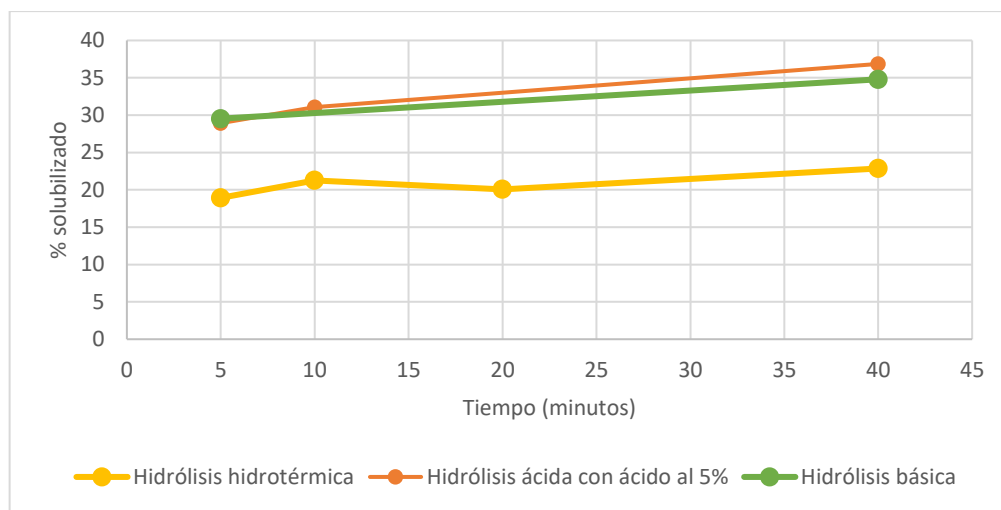
**Tabla 10.** Peso húmedo y seco de los sólidos hidrolizados (g), % solubilizado

| Tratamiento                                    | Peso húmedo (g) | Peso seco (g) | % solubilizado |
|--|-----------------|---------------|----------------|
| 135°C 5 min                                    | 55.30           | 12.16         | 18.93          |
| 135°C 10 min                                   | 53.68           | 11.81         | 21.26          |
| 135°C 20 min                                   | 54.58           | 11.99         | 20.06          |
| 135°C 40 min                                   | 52.59           | 11.57         | 22.86          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 5 min  | 48.46           | 10.66         | 28.93          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 10 min | 47.04           | 10.34         | 31.06          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 40 min | 43.09           | 9.47          | 36.86          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% 135°C 5 min | 43.2            | 9.50          | 36.66          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 15% 135°C 5 min | 44.5            | 9.79          | 34.73          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20% 135°C 5 min | 45.42           | 9.99          | 33.40          |
| NaOH 5% 135°C 5 min                            | 48.06           | 10.57         | 29.53          |
| NaOH 5% 135°C 40 min                           | 44.48           | 9.78          | 34.8           |

A partir del peso húmedo separado con el tamiz y considerando un valor medio de humedad en estas muestras del 78%, se calculó el peso seco correspondiente y considerando que la cantidad de cascarilla inicial era de 15 g (peso seco), se calcula el porcentaje de sólido solubilizado con los tratamientos. Como se observa en la Tabla 10, a mayor cantidad de peso húmedo de los sólidos, menor es el porcentaje solubilizado.

En la Figura 38, se muestran los porcentajes solubilizados de las diferentes hidrólisis hidrotérmicas, básica y ácidas con ácido al 5%, con respecto al tiempo de tratamiento (minutos). En las hidrólisis químicas el porcentaje de solubilizado es mayor que en las hidrólisis hidrotérmicas, aumentando

además ligeramente con el tiempo de tratamiento. En las hidrólisis hidrotérmicas no se aprecia ninguna mejora en el porcentaje de solubilización a partir de los 10 min. El máximo valor alcanzado fue una solubilidad próxima al 37% que se consigue a los 40 min de tratamiento con ácido al 5% y también a los 5 min de tratamiento con ácido al 10%. Es curioso que concentraciones superiores de ácido no consiguen incrementar la solubilidad de los sólidos.



**Figura 38.** Porcentajes solubilizados con respecto al tiempo de las diferentes hidrólisis hidrotérmicas, básicas y ácidas con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5%.

#### 4.3.2. Eficacia de extracción de azúcares reductores

Con el fin de determinar la eficacia de los procesos de hidrólisis ensayados, se calculó el porcentaje de los azúcares reductores extraídos con respecto a los azúcares potenciales reductores.

En la Tabla 11, se muestran las eficacias de extracción tras las cuatro hidrólisis hidrotérmicas realizadas durante distintos tiempos a  $135^\circ\text{C}$ . En los cuatro tratamientos se consigue extraer azúcares reductores, siendo mayor la eficacia de extracción en el ensayo realizado durante 40 min. Además, en todas las hidrólisis hidrotérmicas se consigue una mayor eficacia de extracción que en la muestra sin tratar.

**Tabla 11.** Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis hidrotérmicas (%).

| Tratamiento     | Eficacia de extracción (%) |
|-----------------|----------------------------|
| Sin tratamiento | 3.07                       |
| 135°C 5 min     | 6.52                       |
| 135°C 10 min    | 8.20                       |
| 135°C 20 min    | 8.31                       |
| 135°C 40 min    | 9.52                       |

En las siguientes tablas, se recogen los datos de eficacia de extracción, expresado en porcentaje, de los distintos tratamientos ácido- térmicos a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones de ácido.

**Tabla 12.** Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis ácido térmicas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% a diferentes tiempos (%).

| Tratamiento     | Eficacia de extracción (%) |
|-----------------|----------------------------|
| Sin tratamiento | 3.07                       |
| 5% 135°C 5 min  | 33.28                      |
| 5% 135°C 10 min | 33.90                      |
| 5% 135°C 40 min | 31.90                      |

Tras observar los resultados de la Tabla 12, se observa que el empleo de ácido permite incrementar considerablemente la eficacia de extracción. En este caso no aumenta el porcentaje de eficacia con respecto al tiempo, ya que en el tiempo máximo de 40 min la eficacia calculada es ligeramente inferior a la obtenida con 5 y 10 min, respectivamente. Los datos de la Tabla 13 muestran que un aumento en la concentración de ácido permite incrementar la eficacia de extracción de manera que el mayor porcentaje de eficacia se consigue en la hidrólisis ácido- térmica con ácido al 10% a una temperatura de 135°C durante un tiempo de 5 min.

**Tabla 13.** Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis ácido térmica con ácido a distintas concentraciones (%).

| Tratamiento     | Eficacia de extracción (%) |
|-----------------|----------------------------|
| Sin tratamiento | 3.07                       |
| 10% 135°C 5 min | 47.61                      |
| 15% 135°C 5 min | 42.50                      |
| 20% 135°C 5 min | 42.95                      |

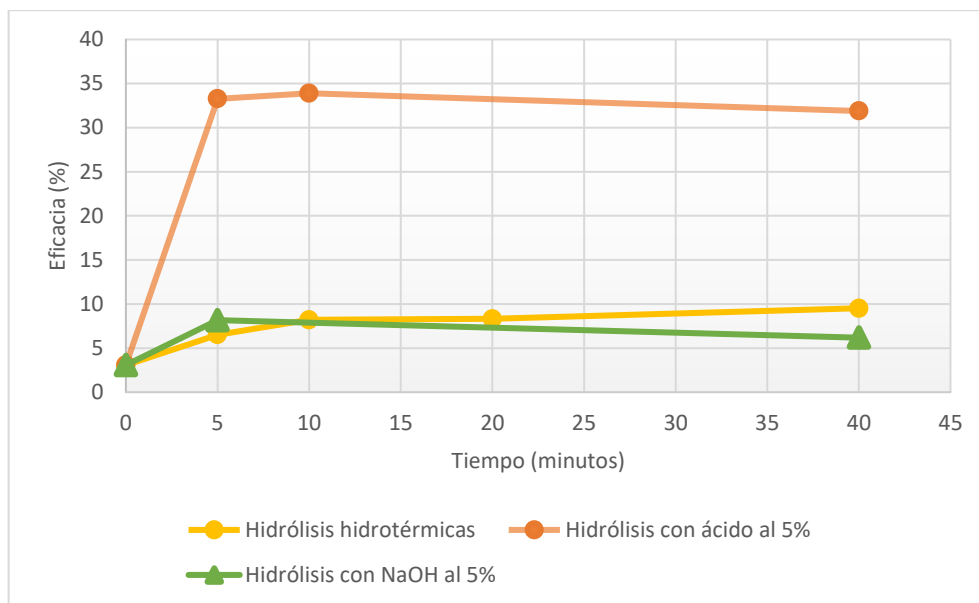
Los porcentajes de eficacias de extracción de azúcares reductores obtenidos en las hidrólisis básico-térmicas se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Eficacia de extracción de azúcares reductores de las hidrólisis básicas con NaOH a distintos tiempos (%).

| Tratamiento          | Eficacia de extracción (%) |
|----------------------|----------------------------|
| Sin tratamiento      | 3.07                       |
| NaOH 5% 135°C 5 min  | 8.17                       |
| NaOH 5% 135°C 40 min | 6.20                       |

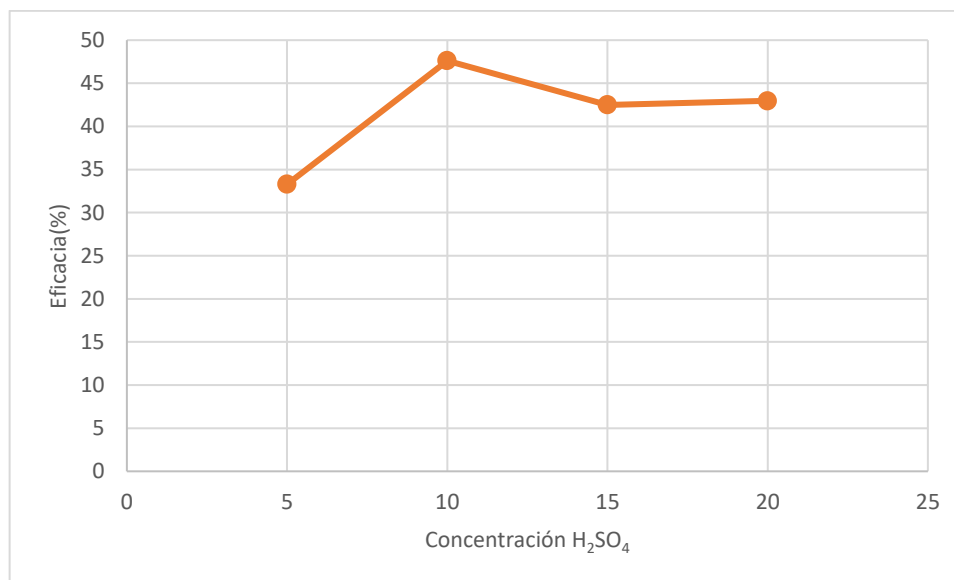
En la tabla anterior, se puede ver que la eficacia de extracción de la hidrólisis básico-térmica disminuye al aumentar el tiempo de ensayo. Además, en este caso las eficacias son muy similares a las obtenidas con el tratamiento hidrotérmico, con lo que no merece la pena adicionar el reactivo básico.

En la Figura 39, se muestra una comparación de las eficacias de los distintos tratamientos hidrotérmicos, los ensayos ácido-térmicos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% a diferentes tiempos y las hidrólisis básicas. Se puede observar claramente la superioridad de las eficacias de extracción en el caso de las hidrólisis ácidas en sus diferentes tiempos.



**Figura 39.** Comparación de las eficacias (%) de las hidrólisis hidrotérmicas, con ácido al 5% y con NaOH al 5%.

En la Figura 40, se puede observar el porcentaje de eficacia de extracción tras los diferentes tratamientos empleados concentraciones de ácidos diferentes, siendo la mayor eficacia de extracción de azúcares reductores al utilizar  $H_2SO_4$  al 10%.



**Figura 40.** Eficacias (%) de las hidrólisis ácido térmicas empleando diferentes concentraciones de ácido.

Como conclusión de todos los tratamientos de hidrólisis, se puede decir que, en función de la concentración de azúcares obtenidos, el tratamiento más adecuado sería el de la hidrólisis ácido-térmica con  $H_2SO_4$  al 10%, a una temperatura de  $135^\circ C$  durante un tiempo de 5 min, ya que es el que



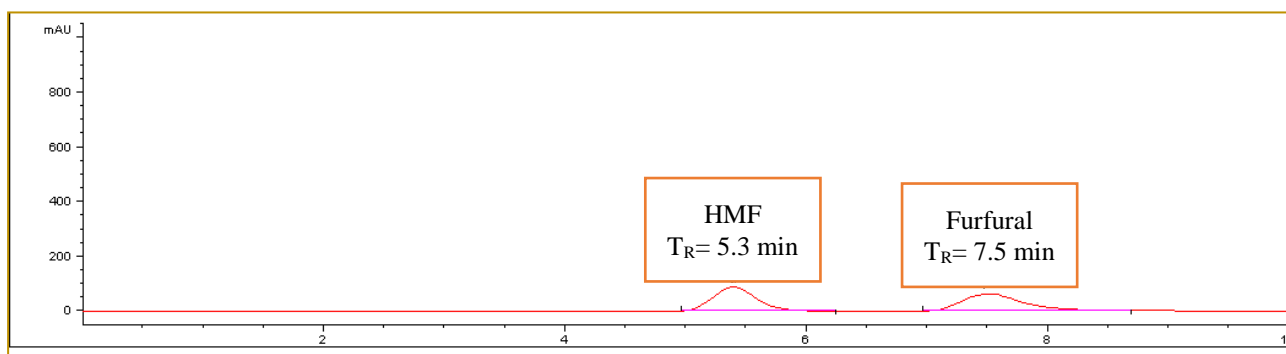
permite extraer una mayor cantidad de azúcares reductores. Por el contrario, el tratamiento menos adecuado sería la hidrólisis básico-térmica con NaOH, ya que no se consigue ningún beneficio significativo y supone un gasto de reactivo.

#### 4.3.3. Presencia de inhibidores

Los tratamientos de hidrólisis a ciertas condiciones pueden llevar a la formación de compuestos inhibidores del crecimiento microbiano en posteriores procesos fermentativos (Hamelinck et al., 2005). Por este motivo, se analizaron los caldos resultantes de las hidrólisis hidrotérmicas y las hidrólisis ácidas con el objetivo de determinar si son apropiados para la posterior fermentación. Como se mencionó anteriormente, entre estos compuestos se incluyen el ácido acético (descomposición inicial de las hemicelulosas), el furfural (deshidratación de pentosas) y el HMF (deshidratación hexosas) (Romero et al., 2007).

Como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos, el análisis de inhibidores se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con las condiciones adecuadas para cada compuesto. Para cuantificar cada compuesto, se identificaba previamente su tiempo de retención: para el ácido acético a los 33.1 min, 5.3 min para el HMF y 7.5 min para el furfural. Con estos tiempos se detecta la presencia o ausencia del compuesto inhibidor y con las áreas integradas se conoce la concentración de los mismos mediante la recta de calibrado correspondiente.

En la Figura 41, se muestra un cromatograma de un patrón de furfural e hidroximetilfurfural con sus correspondientes tiempos de retención.

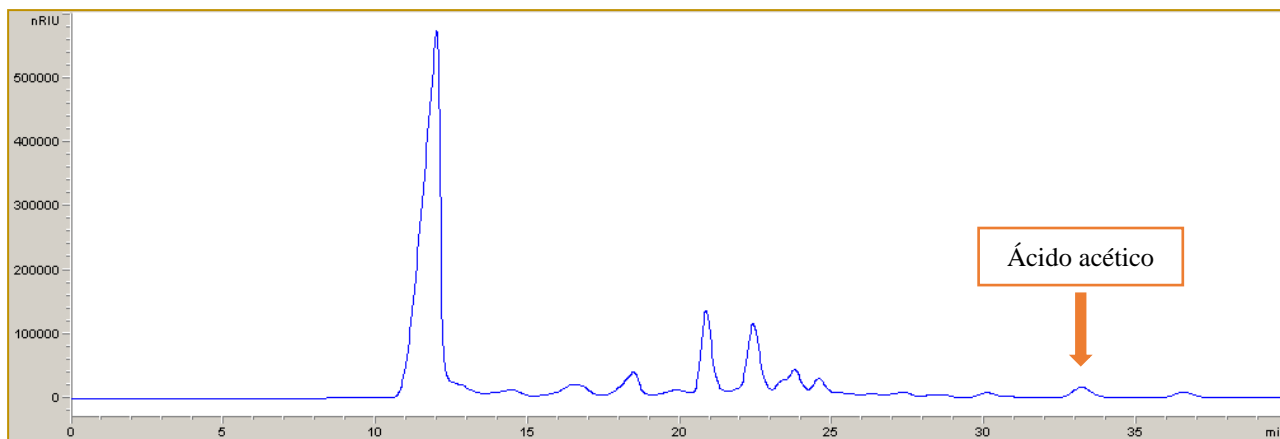


**Figura 41.** Cromatograma del patrón de 25 ppm de HMF y furfural.

### a. Ácido acético

El ácido acético es considerado inhibidor a partir de una concentración de 4 g/L, aunque depende de factores como la cantidad de azúcares o las condiciones del proceso fermentativo (Oviedo B. et al., 2012).

En la Figura 42, se muestra un ejemplo del cromatograma para el ácido acético de uno de los tratamientos de hidrólisis ácido-termica.



**Figura 42.** Cromatograma para el ácido acético en el tratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% durante 40 min.

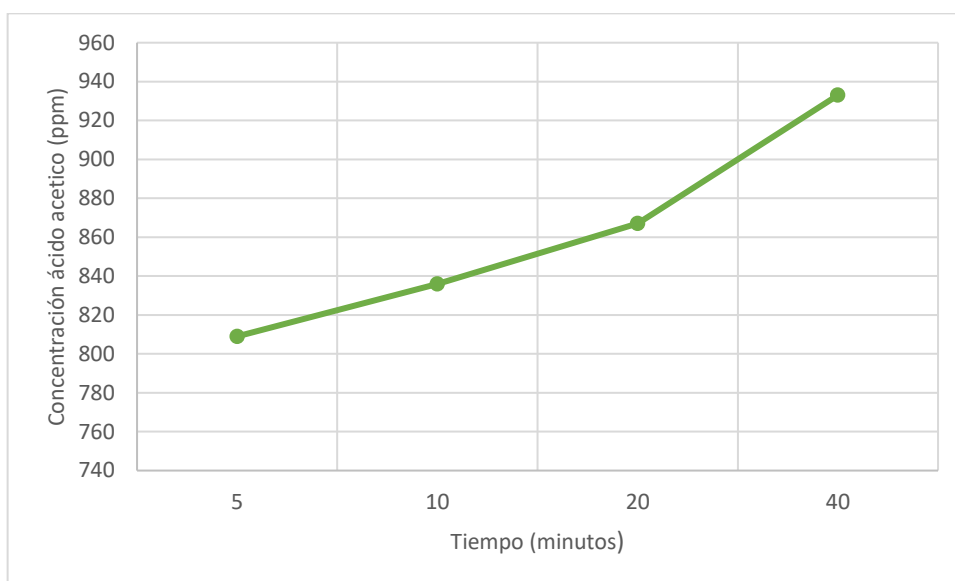
En la Tabla 15, se registra la concentración, media de los triplicados, de ácido acético de los diferentes tratamientos.

**Tabla 15.** Concentración en ppm del ácido acético y el área dada por el cromatograma (mAU).

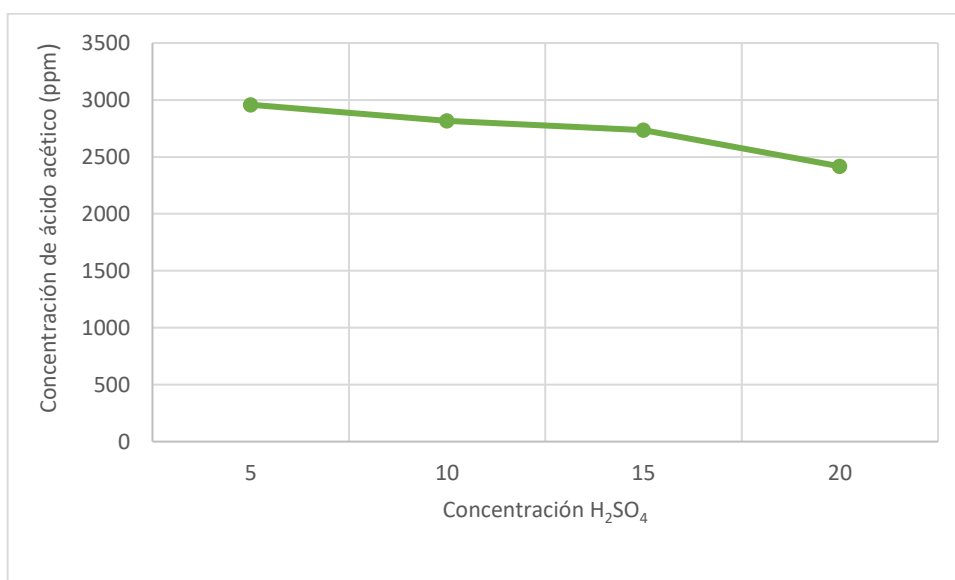
| Tratamiento                                    | Área (mAU) | Concentración (ppm) |
|--|------------|---------------------|
| 135°C 5 min                                    | 188332     | 809 ± 101.25        |
| 135°C 10 min                                   | 200108     | 836 ± 4.92          |
| 135°C 20 min                                   | 201752     | 867 ± 11.66         |
| 135°C 40 min                                   | 233579     | 933 ± 3.62          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 5 min  | 679430     | 2958 ± 11.60        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 10 min | 654313     | 2881 ± 56.81        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 40 min | 616311     | 2650 ± 119.32       |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% 135°C 5 min | 667546     | 2816 ± 13.17        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 15% 135°C 5 min | 549445     | 2736 ± 138.95       |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20% 135°C 5 min | 607030     | 2417 ± 80.15        |

Comparando las concentraciones de ácido acético en las diferentes hidrólisis, se puede observar que la mayor concentración de este inhibidor se obtuvo en la hidrólisis ácida con ácido al 5%, a una temperatura de 135°C durante 5 min.

En las hidrólisis hidrotérmicas la concentración de ácido acético aumenta a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, pasando lo contrario con las hidrólisis ácido-térmicas empleando ácido al 5% que disminuye con el tiempo. Además, la concentración del ácido acético como inhibidor disminuye al aumentar la concentración de  $H_2SO_4$  (Figuras 43 y 44).



**Figura 43.** Concentración de ácido acético (ppm) en las diferentes hidrólisis hidrotérmicas.



**Figura 44.** Concentración de ácido acético (ppm) en las hidrólisis a diferentes concentraciones de ácido.

Teniendo en cuenta el dato bibliográfico de la concentración mínima para que el ácido acético se considere inhibidor del proceso fermentativo, los resultados obtenidos en este proyecto estarían por debajo de 4 g/L en todos los casos (entre 0.8 y 3 g/L). Por tanto, la concentración de ácido acético se encuentra por debajo del límite establecido y se espera que no tenga influencia en la posterior fermentación.

#### b. Hidroximetilfurfural (HMF)

La concentración de HMF mínima que se considera negativa para el proceso fermentativo no está muy clara, siendo distintas las concentraciones señaladas como inhibitorias por diferentes autores. Según Liu et al. (2009) a partir de 2.5 g/L se observan efectos adversos en la fermentación, mientras que en otra investigación llevada a cabo por Lee & Jeffries (2011) es a partir de 5 g/L cuando el HMF influye en el proceso fermentativo.

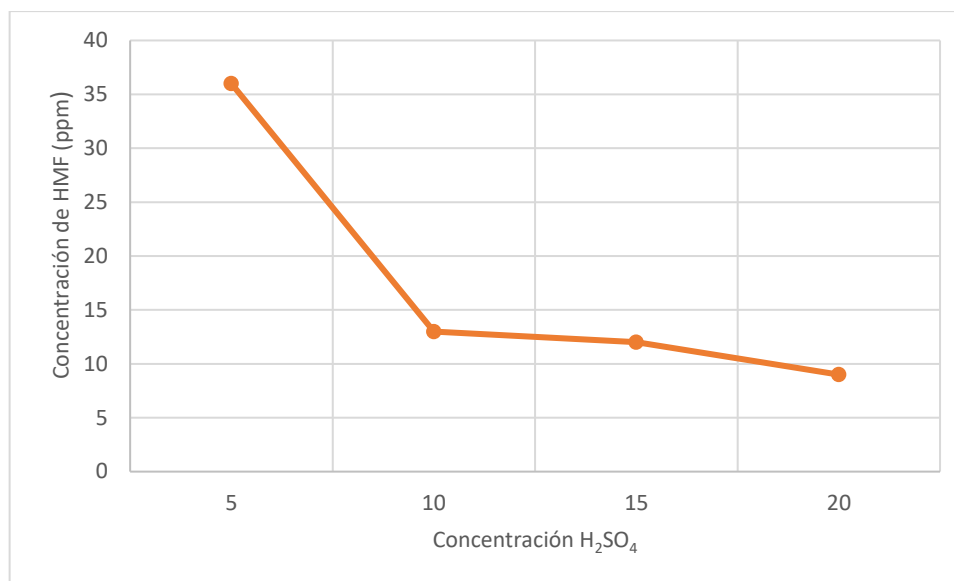
Los resultados de la concentración del HMF calculada a partir de las áreas, mediante la recta de calibrado, se recogen en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Concentración en ppm del ácido acético y el área dada por el cromatograma (mAU).

| Tratamiento                                    | Área (mAU) | Concentración (ppm) |
|--|------------|---------------------|
| 135°C 5 min                                    | -          | <10                 |
| 135°C 10 min                                   | 95         | <10                 |
| 135°C 20 min                                   | 237        | <10                 |
| 135°C 40 min                                   | 653        | <10                 |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 5 min  | 2926       | 36 ± 1.07           |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 10 min | 3100       | 33 ± 0.76           |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5% 135°C 40 min | 241.       | 23 ± 1.94           |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% 135°C 5 min | 946        | 13 ± 0.36           |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 15% 135°C 5 min | 1631       | 12 ± 5.50           |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20% 135°C 5 min | 877        | 9 ± 0.42            |

Como se puede ver en la tabla anterior, la concentración de HMF en las hidrólisis hidrotérmicas está por debajo de límite de cuantificación del equipo y por eso se indica una concentración menor de 10 ppm.

Por otro lado, las hidrólisis ácido térmicas con ácido al 5% son las que mayor concentración de HMF presentan, disminuyendo a medida que se aumenta el tiempo de tratamiento. Además, al aumentar la concentración de  $H_2SO_4$  disminuye la concentración de dicho compuesto inhibidor (Figura 45).



**Figura 45.** Concentración de HMF (ppm) en las hidrólisis a diferentes concentraciones de ácido.

Comparando los datos bibliográficos del límite de concentración del HMF, igual que en el caso del ácido acético, la cantidad obtenida en este proyecto (0-0.04 g/L) es mucho menor que las indicadas en la bibliografía como inhibitorias (2.5-5 g/L). Por tanto, en las muestras tratadas con los ensayos indicados anteriormente no habría inhibición en el proceso de fermentación.

### c. Furfural

Dentro de los compuestos furánicos (HMF, furfural...), el furfural es el que más efecto inhibitorio presenta sobre la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* (Vejarano Mantilla, R. D., 2013).

Hay diferentes estudios que hacen referencia a la concentración a partir de la cual el furfural produce efectos adversos en la fermentación. En algunas investigaciones la producción de etanol disminuye en un 78% con una concentración de furfural de 0.46 g/L, mientras que con 1.2 g/L de concentración la inhibición puede ser total. Una concentración de 1 g/L es capaz de inhibir el crecimiento celular del microorganismo (Vejarano Mantilla, R. D., 2013; Bernier Oviedo, D. J., & Rincón Moreno, J. A. 2012). Además, existen otros estudios que demuestran que el furfural puede ser convertido, por microorganismos con actividad fermentativa, en un compuesto que produzca menos efecto inhibitorio (ácido furoico) (Andersen et al, 2012).

Como ya se mencionó en Materiales y Métodos, en este proyecto, no fue posible determinar con exactitud la concentración de furfural porque nos solapaba con otros compuestos. Para obtener el valor límite de la concentración de dicho compuesto inhibidor, se doparon las muestras con distintas concentraciones de furfural. De esta manera, se obtuvo en el cromatograma el área del “pico” correspondiente a dicho compuesto inhibidor y se pudo calcular de manera aproximada la concentración mínima de furfural que podía ser identificada en el cromatograma, siendo esta menor de 100 ppm.

En ninguno de los caldos obtenidos a partir de los tratamientos realizados se pudo identificar el “pico” correspondiente al furfural con lo que se puede afirmar que en todos los casos la concentración de este compuesto estuvo por debajo de las 100 ppm (0.1 g/L) y por tanto por debajo de los valores considerados inhibitorios.

En nuestros tratamientos se producen concentraciones de compuestos inhibidores por debajo de la concentración que se considera límite para tener efectos negativos en el posterior proceso fermentativo por lo que no sería necesaria una etapa de detoxificación.

## 5. CONCLUSIONES

A continuación, se detallan las conclusiones extraídas a partir de los resultados conseguidos en la elaboración de este proyecto:

- ❖ El empleo de ácido o base, permite aumentar la cantidad de cascarilla solubilizada en relación a los tratamientos hidrotérmicos.
- ❖ De las hidrólisis hidrotérmicas llevadas a cabo, se obtiene una mayor cantidad de azúcares reductores a unas condiciones de 135°C durante 40 minutos.
- ❖ Los resultados de las hidrólisis básico-térmicas con NaOH al 5% fueron los que presentaban un porcentaje de eficacia de extracción más bajo.
- ❖ Los mejores resultados, en relación a la cantidad de azúcares reductores extraídos, se consiguieron con las hidrólisis ácido-térmicas. En concreto, la máxima eficacia de extracción (47.6%) se consiguió con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% a un tiempo de 5 minutos.
- ❖ Aunque se detectó presencia de compuestos inhibidores (ácido acético, HMF y furfural) en todas las muestras analizadas de los tratamientos hidrotérmicos y ácido-térmicos. La concentración de estos compuestos estaba, en todos los casos, por debajo de las concentraciones descritas como inhibitorias en la bibliografía. Por lo que se espera que no sean un problema para la actividad fermentativa en un proceso posterior.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Andersen, F., Moreno, S., y Díaz, S. (2012). “Determinación de parámetros cinéticos en modelos de producción de bioetanol a partir de glucosa y xilosa en presencia de furfural”. Conference Paper: 2do Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos, At La Plata, Buenos Aires.
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Restani, P., & Martelli, A. (2001). Characterization of pectins and some secondary compounds from *Theobroma cacao* hulls. *Journal of Food Science*, 66(5), 653-656.
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food research international*, 38(8-9), 1009-1014.
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food research international*, 38(8-9), 1009-1014.
- Baiano, A. (2014). Recovery of biomolecules from food wastes—a review. *Molecules*, 19(9), 14821-14842.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*, 52(2), 858-875.
- Batista, L. (2009). *Guía técnica: el cultivo de cacao* (No. F01-41).
- Baud, I. S. A., Post, J., & Furedy, C. (Eds.). (2006). Solid waste management and recycling: actors, partnerships and policies in Hyderabad, India and Nairobi, Kenya (Vol. 76). *Springer Science & Business Media*.
- Beckett, S. T. (2008). The science of chocolate, Royal Society of Chemistry. *Cambridge, United Kingdom*.
- Bello Gil, D., Carrera Borcourt, E. et Díaz Maqueira, Y. (2006). “Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico”. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). N°2
- Bernier Oviedo, D. J., & Rincón Moreno, J. A. (2012). Estudio de agentes inhibitorios en el proceso de fermentación en la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico y amiláceo.



- Bernier Oviedo, Daniel José y Rincón Moreno, John Anderson (2012). Estudio de agentes inhibitorios en el proceso de fermentación en la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico y amiláceo [ed.] Programa de Ingeniería Agroindustrial. s.l. : Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Agronómica., pág. 121.
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Hannum, S. M., & Gershwin, M. E. (2000). Cocoa and chocolate: Composition, bioavailability, and health implications. *Journal of Medicinal Food*, 3(2), 77e105.
- Correa, J. F., Ruiz, Á. A., & Garrote, G. (2012). Estudio del tratamiento hidrotérmico de fruta de banano. *Afinidad*, 69(559).
- Corredor, Y. A. V., & Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*.
- De la Mota, I. (2008) El libro del chocolate. España: Ediciones Pirámide p (26-89).
- Díaz, A.I., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M., (2017). “Treatment of supermarket vegetable wastes to be used alternative substrates in bioprocesses”. *Waste Management*
- Díaz. A.I. (2015). “Hidrólisis de residuos de la venta de verduras y hortalizas para la producción de bioetanol”. Trabajo Fin de Máster de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Robers, P.A.; Smith, F. (1956). “Colorimetric method for the determination of sugars and related substances”. *Anal. Biochem.* Vol. 28, pp. 350-356
- Fowler, M. S. (2009). Cocoa beans: from tree to factory. *Industrial chocolate manufacture and use*, 4, 137-152.
- García, O. A. C. (2010). Obtención del extracto polar etanol: agua (1: 1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana (Doctoral dissertation, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Tecnología Química).
- Garzón Castaño, S.C and Hernández Londoño, C. (2009). “Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950”. Tesis de la Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química.
- Gerena, F. M. (2013). “Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* l var valencia) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad

- diacol capiro* (r-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos”. Trabajo de fin de grado de la escuela de ciencias básicas tecnológicas e ingeniería de Duitama. UNAD.
- Gyedu-Akoto, E., Yabani, D., Sefa, J., & Owusu, D. (2015). Natural Skin-care Products: The Case of Soap Made from Cocoa Pod Husk Potash. *Advances in Research*, 4(6), 365-370.
- Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and bioenergy*, 28(4), 384-410.
- Hernández C. (2017). Obtención de bioetanol a partir de hidrolizados de residuos de fruta. Trabajo Fin de Máster de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.
- Hernández-Cázares, A. S., Real-Luna, N., Delgado-Blancas, M. I., Bautista-Hernández, L., & Velasco-Velasco, J. (2016). Residuos agroindustriales con potencial de compostaje.
- Kim, D. (2018). Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review. *Molecules*, 23(2), 309.
- Lateef, A., Oloke, J. K., Kana, E. G., Oyeniya, S. O., Onifade, O. R., Oyeleye, A. O., & Oyelami, A. O. (2008). Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2369-2374.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104(3), 948-954.
- Lee, J. W., & Jeffries, T. W. (2011). Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresource technology*, 102(10), pp. 5884-5890.
- Lenihan, P. et al. (2011). “Kinetic modelling of dilute acid hidrolisis of lignocellulosic Biomass”. *Biofuel Production*, Vol. 12, pp. 293-307. (Nothern Ireland). DOI: 10.5772/17129
- Ley 22/2011, de 28 de Julio, sobre residuos y suelos contaminados *Boletín Oficial del Estado*, 181, de 29 de Julio de 2011. Recuperado de: <https://www.boe.es/boe/dias/2011/07/29/pdfs/BOE-A-2011-13046.pdf>

- Linde, M., Galbe, M., & Zacchi, G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and microbial technology*, 40(5), 1100-1107.
- Liu, L., et al. (2009). "Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways". *Mol Genet Genomics*, Vol. 282, pp. 233-244
- Loardo, C., Mercedes, L., & Rivera Azorsa, M. (2016). Obtención de Fibra Dietética a Partir de Bagazo de *Zea Mayz* l. Caña de Maíz" Como Ingrediente Funcional por Medios Enzimáticos.
- Lu, F., Rodríguez-García, J., Van Damme, I., Westwood, N., Shaw, L., Robinson, J. S. & Faas, L. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39-45.
- Mendes, F. A. T., & Lima, E. L. (2007). Perfil agroindustrial do processamento de amêndoas de cacau em pequena escala no Estado do Pará. Belém, PA: *SEBRAE*.
- Mojica-Pimiento, A., & Paredes-Vega, J. E. (2006). Características del cultivo del cacao en Santander. *Ensayos Sobre Economía Regional; No. 40*.
- Montañez, J.L., Victoria, J.C., Flores, R. and Vivar, M.A. (2011). "Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol". *Información Tecnológica*. Vol. 22, núm. 6.
- Muñoz, D. M., Cuatin, M. F., & Pantoja, A. J. (2015). Potencial energético de residuos agroindustriales del departamento del Cauca, a partir del poder calorífico inferior. *Ingresar a la revista*, 11(2), 156-163.
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource technology*, 93(1), 1-10.
- Nazir, N., Juita, E., Amelia, C., & Fatli, R. (2016). Optimization of Pre-treatment Process of Cocoa Pod Husk Using Various Chemical Solvents. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 6(3), 403-409.

- Ntiamoah, A., & Afrane, G. (2008). Environmental impacts of cocoa production and processing in Ghana: life cycle assessment approach. *Journal of Cleaner Production*, 16(16), 1735-1740.
- Oddoye, E. O., Agyente-Badu, C. K., & Gyedu-Akoto, E. (2013). Cocoa and its by-products: identification and utilization. In *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 23-37). Humana Press, Totowa, NJ.
- Okiyama, D. C., Navarro, S. L., & Rodrigues, C. E. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 103-112.
- Oviedo, B., José y Rincón, D. y Anderson, J. (2012) “Estudio de agentes inhibitorios en el proceso de fermentación en la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico y amiláceo”. [ed.] Programa de Ingeniería Agroindustrial.
- Prasad, M., Simmons, P., & Maher, M. J. (2004). Release characteristics of organic fertilizers. *Acta Horticulturae*, 644, 163e170.
- Ramírez S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanun tuberosun*) para la producción de *Trichoderma spp*. Trabajo de grado, Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Restrepo A, Rodríguez E y Manjarrés K. 2011. Cortezas de naranja comestibles: una aproximación al desarrollo de productos con valor agregado a partir de residuos agroindustriales. *Producción + limpia*, 6(2):47-57.
- Riaño, A. M. S. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1(5).
- Rogers, P. L., Jeon, Y. J., Lee, K. J., & Lawford, H. G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. In *Biofuels* (pp. 263-288). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Romero, I., Moya, M., Sánchez, S., Ruiz, E., Castro, E., & Bravo, V. (2007). Ethanolic fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. *Industrial crops and products*, 25(2), 160-168.
- Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30(11), 671-678.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.

- Soto, M. (2012). Desarrollo del proceso de producción de cascarilla de semilla de cacao en polvo destinada al consumo humano. Obtenido de Tesis de grado, Universidad de Simón Bolívar.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2(3), 472-499.
- Talebna, F., & Taherzadeh, M. J. (2006). In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 125(3), 377-384.
- Torry-smith, M., 2002. Optimization of Biological Processes Applied to Bioethanol Production Biocentrum. Technical University of Denmark, Lyngby.
- VALORIZACION-FRUITS-IN, A. W. (2008). Valorización de residuos agroindustriales–frutas–en Medellín y el sur del valle del aburrá, Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 61(1), 4422-4431.
- Vejarano Mantilla, Ricardo David (2013). Utilización de bloqueadores metabólicos y optimización de las condiciones de aplicación para la reducción del grado alcohólico en vinos elaborados a partir de uva procedente de zonas cálidas. 2013. Universidad Politécnica de Madrid, 2013, Tesis Doctoral, pág. 293.
- Villamizar, A., & López, L. (2016). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Revista Científica de la Universidad Francisco de Paula Santander*, 9.
- Vojvodić, A., Komes, D., Vovk, I., Belščak-Cvitanović, A., & Bušić, A. (2016). Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food research international*, 89, 565-573.
- VRIESMAN, L. C. Pectina das cascas do fruto do cacau (*Theobroma cacao* L.) (2012). Optimizaçõ de extraçõ e caracterizaçõ. Curitiba, Brasil.
- Yahya, M. A., Al-Qodah, Z., & Ngah, C. Z. (2015). Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 46, 218-235.

## REFERENCIAS WEB

WEB 1 (Junio, 2019): <https://www.icco.org/about-us/icco-news/405-february-2019-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>

WEB 2 (Mayo, 2019): [https://tengo17yestoyloco.files.wordpress.com/2012/04/apuntes-de-bioqu3admica\\_metabolismo3.pdf](https://tengo17yestoyloco.files.wordpress.com/2012/04/apuntes-de-bioqu3admica_metabolismo3.pdf)

WEB 3 (Mayo, 2019): [https://www.ub.edu/web/ub/es/menu\\_eines/noticies/2017/02/027.html](https://www.ub.edu/web/ub/es/menu_eines/noticies/2017/02/027.html)

WEB 4 (Mayo, 2019): <https://revalidasiesifach.wordpress.com/2017/01/27/oligosacaridos/>

WEB 5 (Junio, 2019): <http://apuntescientificos.org/clasificacion-defini.html>

WEB 6 (Junio, 2019): <https://es.slideshare.net/karloz3033/informe-3fermentacin-de-glcidos-por-levaduras-saccharomyces-biotecnologia>

WEB 7 (Junio, 2019): <https://www.20minutos.es/noticia/3315828/0/chocolate-cacao-saludable-mercado-bombones-tabletas-comida-desayuno/#xtor=AD-15&xts=467263>

WEB 8 (Junio, 2019): [http://produlce.com/cacao-y-chocolate\\_1](http://produlce.com/cacao-y-chocolate_1)

WEB 9 (Junio, 2019): <http://ysidescubrimosasturias.blogspot.com/2016/04/el-chocolate-en-asturias.html>

WEB 10 (Junio, 2019): [https://www.einforma.com/servlet/app/portal/UNI/id\\_sess/00102657920000176533910000045504/prod/INF\\_BASICA\\_REGISTRADOS/ID\\_PROMOCION/766/nif/dZhvxjj2-enkCvBud1qzJA/NUEVO\\_REGISTRADO/1/id\\_sess/00102657920000176533910000045504](https://www.einforma.com/servlet/app/portal/UNI/id_sess/00102657920000176533910000045504/prod/INF_BASICA_REGISTRADOS/ID_PROMOCION/766/nif/dZhvxjj2-enkCvBud1qzJA/NUEVO_REGISTRADO/1/id_sess/00102657920000176533910000045504)