

**EXTRACCIÓN DE PECTINAS A PARTIR DE LOS SUBPRODUCTOS DEL
BENEFICIO DEL CACAO**

LUCAS D. BETANCOURT LATORRE

JUAN E. LLANO MORENO

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2009.

**EXTRACCIÓN DE PECTINAS A PARTIR DE LOS SUBPRODUCTOS DEL
BENEFICIO DEL CACAO**

LUCAS D. BETANCOURT LATORRE

200310016004

JUAN E. LLANO MORENO

200329100004

**Trabajo de grado investigación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros de Procesos**

ASESOR: IQ. Ph.D. en Química

GUILLERMO L. PALACIO G

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2009

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Medellín, 16 de Abril de 2009

En cambio, graznan sin cesar cual grajos:

“Estos trabajos os darán el cielo;

Son un consuelo; preferible holgorio

Al Purgatorio”

Que clame y grite solapada secta

Y haga colecta por fundar hospicios,

Donde sus vicios con cautela tapa,

No se me escapa.

Antonio J. Restrepo, Ni Rey ni Roque.

AGRADECIMIENTOS

GUILLERMO L. PALACIO G, profesor catedrático de química orgánica e investigador de la Universidad EAFIT, por el conocimiento compartido, por el apoyo incondicional durante toda nuestra vida académica, la asesoría en esta investigación y su amistad.

EDGAR ARBELÁEZ, coordinador de los laboratorios de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT, por su colaboración y asesoría en el desarrollo de este proyecto.

JOHN JAIRO ESTRADA, auxiliar de los laboratorios de Ingeniería de Procesos, por la colaboración prestada durante la realización del proyecto.

DAVID ESTEBAN SUAREZ S y JULIO HERNANDO PIEDRAHITA HOYOS, compañeros de penurias y alegrías, que nuestra amistad perdure.

A NUESTRAS FAMILIAS, por el apoyo, la confianza y las oportunidades brindadas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. OBJETIVOS	4
1.1 OBJETIVO GENERAL	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 CACAO	5
2.1.1 Variedades	5
2.1.2 Enfermedades	6
2.1.3 Recolección	6
2.1.4 Fermentación	7
2.1.5 Secado	7
2.1.6 Descascarillado	8
2.1.7 Molienda	8
2.1.8 Prensado	8
2.2 PECTINA	8
2.2.1 Definición y localización	8
2.2.2 Función y solubilidad	9
2.2.3 Utilización y Contenido en los Alimentos	10
2.2.4 Estructura	11

2.2.5 Proceso de Extracción.....	12
2.2.5.1 Selección del material	12
2.2.5.2 Inactivación de las enzimas pécticas.....	12
2.2.5.3 Hidrólisis Ácida.....	12
2.2.5.4 Filtración de residuos	13
2.2.5.5 Precipitación.....	13
2.2.5.6 Secado	13
2.2.5.7 Determinación del grado de esterificación de la pectina.	13
2.2.5.8 Determinación de la viscosidad intrínseca de muestras de pectina	14
2.3 ALGUNOS ANTECEDENTES	15
3. METODOLOGÍA	20
3.1 MATERIALES Y EQUIPOS	22
3.1.1 Reactivos y Material vegetal.....	22
3.2 PROCEDIMIENTO DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	23
3.2.1 Preparación del material.....	23
3.2.2 Cocción	23
3.2.3 Ajuste de pH:.....	24
3.2.4 Hidrólisis ácida:	24
3.2.5 Filtración:.....	25
3.2.6 Precipitación.....	26

3.2.7 Separación:	26
3.2.8 Purificación:.....	26
3.2.9 Secado.....	27
3.2.10 Rendimiento:	27
3.2.11 Determinación del grado de esterificación:	28
3.2.12 Contenido de cenizas:	29
3.2.13 Espectroscopia de Infrarrojo:.....	29
3.2.14 Poder de Gelación:.....	30
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	32
4.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	32
4.1.1 Análisis de resultados de pectina la obtenida a partir de la mazorca de cacao....	33
4.1.1.2 Análisis general de la variable “Grado de metoxilación”.....	37
4.2 PECTINA OBTENIDA A PARTIR DE LA CASCARILLA DE LA ALMENDRA DE CACAO	40
4.3 CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS PECTINAS OBTENIDAS CON LA PECTINA COMERCIAL:	40
5. ANÁLISIS ECONÓMICO A NIVEL DE LABORATORIO	44
5.1 COSTOS DE MATERIA PRIMA.....	44
5.2 COSTOS DE SERVICIOS INDUSTRIALES	45
5.3 COSTO DE MANO DE OBRA.....	45
5.4 ALQUILER DE EQUIPOS	46

6. CONCLUSIONES47

7. RECOMENDACIONES48

BIBLIOGRAFÍA50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de pectina en las frutas y verduras (Pagan J, 1998).....	11
Tabla 2. Características de las pectinas (Pagan J, 1998)	14
Tabla 3. Porcentaje de humedad de las mazorcas de cacao	28
Tabla 4. Proporciones para obtener 100 gr. de mermelada.	30
Tabla 5. Factores y niveles del diseño de experimentos.	33
Tabla 6. Resultados de los ensayos.....	33
Tabla 7. Comparación de propiedades	42
Tabla 8. Comparación organoléptica	42
Tabla 9. Costos de Materia Prima	44
Tabla 10. Costos de servicios industriales.....	45
Tabla 11. Costos de mano de obra.....	46
Tabla 12. Costos de alquiler de equipos.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pectina (Calvo, 2007)	9
Figura 2. Cocción del material vegetal	24
Figura 3. Hidrólisis ácida	25
Figura 4. Filtración	25
Figura 5. Precipitación	26
Figura 6. Pectinas purificadas	27
Figura 7. Titulación	29
Figura 8. Resultados “Setting time”	31
Figura 9. Diagrama de Pareto para rendimiento.	34
Figura 10. Diagrama de efectos normal para rendimiento.	34
Figura 11. Diagrama medias de los niveles vs tiempo para rendimiento.	35
Figura 12. Diagrama de Pareto para Grado de Esterificación.	37
Figura 13. Diagrama de efectos normal para Grado de Esterificación.	37
Figura 14. Medias de los niveles vs tiempo.	38
Figura 15. Espectro infrarrojo de la pectina comercial “Rapid set”.	41
Figura 16. Espectro infrarrojo de la pectina de mazorca de cacao.	41
Figura 17. Espectro infrarrojo de la pectina de cascarilla del cacao.	42

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. Diagrama de bloques del proceso

ANEXO II. Tabla de efectos y coeficientes estimados para grado de metoxilación.

ANEXO III. Tabla de efectos y coeficientes estimados para Rendimiento.

RESUMEN

En este estudio se evaluó la posibilidad de obtener pectinas a partir de los subproductos del proceso del beneficio del cacao. Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de desarrollo de productos del departamento de ingeniería de procesos de la universidad EAFIT.

Mediante un diseño de experimentos factorial 2^K con punto medio se evaluaron las variables de respuesta rendimiento y grado de metilación para la pectina obtenida a partir de la mazorca del cacao, los factores del diseño fueron tiempo de cocción (Tc), tiempo de hidrólisis (Th) o extracción y pH de la mezcla antes de la hidrólisis (con ácido clorhídrico al 10%) cuyos niveles fueron 20 min y 30 min, 20 min y 40 min y 1.5 y 2.5 respectivamente. Se encontró que los factores que presentan efectos significativos para la extracción de pectinas fueron Tc y Th. El punto medio mostró los mejores resultados para las variables de respuesta evaluadas, un rendimiento de 4.3% y grado de esterificación de 93%. Con los datos del punto medio se realizó un ensayo para la extracción de pectina a partir de la cascarilla de la almendra del cacao.

La pectina obtenida fue caracterizada, con base en el poder de gelación, contenido de cenizas y espectroscopia infrarroja. Estas pruebas definieron la pectina obtenida como una pectina “ultra rapid set”.

El resultado del análisis económico preliminar de este proceso a escala de laboratorio indica que no es rentable.

INTRODUCCIÓN

Mundialmente la industria del cacao abarca una gran porción del mercado de los alimentos debido a sus diversas maneras de consumo, su sabor y sus propiedades alimenticias, este fruto es rico en carbohidratos, minerales, proteínas y vitaminas por lo tanto, puede ser ampliamente aprovechado.

Colombia, por su situación topográfica, posee las condiciones idóneas para el cultivo del cacao, el cual es la principal materia prima para la fabricación de chocolates. Este país es el sexto productor mundial de granos de cacao, y el tercero de América (Gaitán, 2005.). En Colombia se producen anualmente 55,000 toneladas de almendra de cacao (Fedecacao, 2004) lo que equivale aproximadamente a 180,000 toneladas de fruta teniendo en cuenta que la almendra corresponde al 30% en peso del fruto entero. Por otra parte la Compañía Nacional de Chocolates produce aproximadamente 90 toneladas mensuales de cascarilla de almendra la cual se aprovecha como suplemento de los concentrados para animales.

Por lo anterior, el sector agricultor colombiano está comenzando a mirar con otros ojos el cultivo de cacao, y su posterior transformación a diversos productos, como una alternativa de desarrollo para el sector agrícola e industrial. El proceso de beneficio del cacao tiene como objetivo principal la producción del licor del cacao, posteriormente se puede optar por dos procesos, el primero consiste en utilizar este licor para diversas clases de productos como el chocolate o productos que lo contienen. El segundo proceso consiste en la separación, a partir del licor, de la manteca y la "torta" de cacao, que son a su vez utilizados como productos intermedios para diversos mercados de la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. En el país los grandes monopolios del cacao optan por el primer proceso, generando grandes cantidades de subproductos como la mazorca y la cáscara de la almendra de cacao, los cuales tienen un gran potencial de

explotación en procesos fisicoquímicos, debido a su composición bioquímica, generando interés en su posible aprovechamiento; se sabe que el fruto del cacao como la gran mayoría de vegetales posee en su estructura celular protopectinas, las cuales actúan como soporte para su biomasa, y que, a partir de estas protopectinas, es posible la extracción de pectinas lo que podría generar un valor agregado extra, a los subproductos de la industria cacaotera. (Sánchez, 2003)

La pectina es una materia prima utilizada en la elaboración de diversos productos alimenticios entre los que se encuentran salsas, jugos naturales y jaleas; en estos productos se emplea como espesante y conservante. Sin embargo, a pesar de su importancia es un producto que no se produce en nuestro país, obligando a las empresas que requieren su uso a importarla de países como México, Brasil, Bélgica y Francia (Pescador y Ramírez, 2003).

En este proyecto se determinó el contenido de pectinas en la mazorca y la cascarilla del cacao, y se estableció cómo influyen las variables pH, tiempo de hidrólisis y tiempo de cocción sobre las variables de respuesta rendimiento y grado de esterificación para el proceso de extracción de pectina, a partir de subproductos del beneficio del cacao. Este análisis se apoyó en un diseño de experimentos factorial 2^K con punto en el medio.

Las pectinas obtenidas de la cascarilla de la almendra de cacao y de la mazorca del mismo fruto se caracterizaron con base en el poder de gelación, contenido de ceniza y la espectroscopia de infrarrojo, luego estas pectinas se compararon con una pectina usada comercialmente y se realizó un análisis económico para determinar la viabilidad económica del proyecto a escala de laboratorio.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar un proceso a escala de laboratorio para la extracción de pectinas a partir de residuos de la industria del cacao.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cómo influyen las variables de proceso: pH, tiempo de hidrólisis y tiempo de cocción, sobre las variables de respuesta (rendimiento y grado de metoxilo) mediante el diseño de experimentos.
- Caracterizar las pectinas obtenidas de mejor rendimiento con base en la técnica del infrarrojo, grado de metoxilo, poder de gelación y contenido de cenizas.
- Comparar las pectinas obtenidas en el proyecto con una pectina utilizada a nivel comercial.
- Realizar un análisis económico para determinar la viabilidad económica del proyecto a escala laboratorio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CACAO

Cacao es el nombre común que se le da al árbol *Theobroma cacao* y a los frutos del mismo. El grano de cacao es la materia prima principal de diferentes sectores de la industria alimenticia como confitería y chocolates, además de un insumo natural para la industria cosmética (Rodríguez, 2001).

El árbol de cacao o cacaotero pertenece a la familia de las *Esterculáneas*, es una planta de origen tropical, nativo de América tropical, particularmente en una franja que se extiende desde Brasil hasta México, también presente al oeste de África. Posee una altura entre los 6 y 10 metros, requiere de zonas húmedas y temperaturas entre 20-30°C para su óptimo desarrollo. Necesita de sombra, por lo cual es común su crecimiento cercano a árboles más grandes (Rodríguez, 2001).

2.1.1 Variedades

Entre las variedades más comunes del cacao se encuentran las siguientes:

Forastero (trinitario) o cacao amargo: Originario de América, es la variedad más cultivada en las regiones cacaoteras de África y Brasil. Se caracteriza por sus frutos de cáscara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa y de granos aplanados de color morado y sabor amargo. Dentro de esta especie destacan distintas variedades como Cundeamor, Amelonado, Sambito, Calabacillo y Angoleta (Rodríguez, 2001).

Criollo, o cacao dulce: Esta variedad se caracteriza por sus frutos de cáscara suave y semillas redondas, de color blanco a violeta, dulces y de sabor agradable. La superficie del fruto posee diez surcos longitudinales marcados, cinco de los cuales son más profundos que los que alternan con ellos. Los lomos son prominentes, verrugosos e irregulares (Rodríguez, 2001).

2.1.2 Enfermedades del cacao

Entre las enfermedades más peligrosas, se encuentran la escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa*), la podredumbre negra (*Phytophthora palmivora*, *P. Megakarya*), la Moniliasis o Monilia (*Moniliophthora roreri*), el virus del tallo hinchado (CSSV) y, en la región del Pacífico, el cáncer basidio u *oncobasidium theobromae* (VSD). Con excepción del CSSV y El Mal de Machete (*Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst) estas enfermedades son causadas por hongos y pueden ser tratadas hasta cierto punto con funguicidas preferiblemente de contacto (Oxicloruro de Cu), prácticas de poda de sombra y se recomienda no usar aguas estancadas entre otras prácticas culturales que ayudan a reducir la incidencia de enfermedades hasta un 80 %, lo que permite convivir con las mismas (Rodríguez, 2001).

2.1.3 Recolección

Los árboles de cacao florecen dos veces al año, presentándose su principal período de floración entre los meses de junio y julio. Es común que se presente un segundo período entre los meses de agosto y septiembre, siendo este menos productivo que el anterior. El tiempo de maduración de los frutos del cacao oscila entre los cuatro y los seis meses de acuerdo con la altura sobre el nivel del mar y la temperatura del lugar de cosecha (Rodríguez, 2001).

La recolección es una de las etapas más importantes en el proceso del cacao, debido a que una buena selección de las mazorcas recolectadas es de vital importancia para las características del producto final. Uno de los métodos más comunes para realizar dicha selección es el cambio en la coloración del fruto, el cual varía dependiendo del tipo o variedad. Sin embargo ante la incertidumbre de este método (no recolectar a tiempo mazorcas ya maduras), algunos recolectores seleccionan sólo las mazorcas que se encuentran en la parte baja del árbol. La frecuencia en la recolección debe ser corta evitando así que los frutos se maduren más de lo debido. Si se trata de una plantación grande la recolección puede

hacerse cada 8 o 15 días. Si la plantación es pequeña puede hacerse cada mes (Fedecacao, 2004).

2.1.4 Fermentación

Es en este proceso en el cual el cacao obtiene su calidad óptima para hacer chocolate, eliminando la suciedad de las semillas y dando una buena presentación a las almendras.

“Durante el proceso, la acción combinada y balanceada de temperatura, alcoholes, ácidos, pH y humedad anulan la actividad del embrión, disminuye el sabor amargo por la pérdida de theobromina y se producen las reacciones bioquímicas que forman el chocolate” (Fedecacao, 2004).

Este proceso por lo general no debe llevarse a cabo por más de tres días para el cacao criollo y de ocho días para el cacao forastero. Algunos de los métodos más comunes en esta práctica son la fermentación en sacos, en cajas y en montones. Si este proceso se realiza mal o de manera deficiente se produce el llamado cacao corriente (Fedecacao, 2004).

2.1.5 Secado

Este proceso reduce la humedad restante del proceso de fermentación “Se consigue pasar de almendras con un 55 % de humedad hasta almendras con un 6 - 8 %”, además de reducir su acidez y astringencia. Durante este período las almendras obtienen el sabor y aroma a chocolate, además de otras características físicas como el color marrón propio del cacao fermentado (Fedecacao, 2004).

El método más adecuado para este proceso es el secado natural, que se hace al sol utilizando camillas de madera y carros corredizos, este es reconocido como el mejor debido a la economía y a que genera un mayor aroma en las almendras. Otro método es el secado en silos en el cual la temperatura no debe exceder los 60 °C y por último el secado en estufas en el que se hace uso de una corriente caliente que atraviesa la masa de cacao (Fedecacao, 2004).

2.1.6 Descascarillado

El cacao proveniente del secado se somete al proceso de trituración produciendo una mezcla de cacao y cáscaras trituradas. Esta mezcla se pasa al proceso de tamizado, en el cual las cáscaras son arrastradas por una corriente de aire, dando como resultado un cacao libre de cáscaras. Este producto se conoce como NIB (Fedecacao, 2004).

2.1.7 Molienda

Este proceso reduce el tamaño de partícula a 75 micras. Debido a su contenido graso (superior al 50%), al calor generado en el proceso y al tamaño de partícula logrado, el cacao se transforma en una pasta fluida conocida como licor de cacao. Este licor se almacena en tanques y se esteriliza con el fin de reducir su carga bacteriana a los niveles establecidos en los estándares internacionales (Fedecacao, 2004).

2.1.8 Prensado

El licor de cacao puede ser sometido al proceso de prensado para separarlo en la manteca y la torta de cacao. La manteca resultante se filtra para eliminar sólidos restantes, luego se envasa en cajas para ser exportada. Esta manteca puede ser usada directamente como materia prima en la industria del chocolate. La torta de cacao se pulveriza y se exporta como polvo de cacao o mezclada con vitaminas, azúcar y otros ingredientes para comercializarla como cocoa (Fedecacao, 2004).

2.2 PECTINA

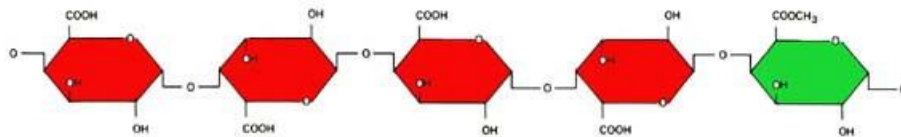
2.2.1 Definición y localización

Las pectinas o sustancias pécticas constituyen un grupo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico y, en menor medida, ramnosa, arabinosa y galactosa. Al igual que en otros grupos de polisacáridos de pared, la definición de pectinas es operativa y se basa en la extracción de la fibra (previamente delignificada) con

soluciones acuosas de un agente quelante o bien, extracción con una solución ácida diluida (en ambos casos la extracción se realiza en caliente) (Pagan J, 1998).

Las pectinas están ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal. Son un componente esencial de las paredes celulares de las plantas dicotiledóneas y también se hallan presentes, aunque en menor grado, en las monocotiledóneas. En las primeras, las pectinas constituyen el componente principal de la lámina media de la pared primaria (Pagan, 1998).

Figura 1. Estructura de la pectina (Calvo, 2007)



2.2.2 Función y solubilidad

Se admite que las pectinas tienen un papel esencial en la estabilidad de la pared al actuar como material aglutinador de las fibras de celulosa. Prueba de ello es que la acción de enzimas que degradan específicamente estas sustancias produce una pérdida de consistencia del tejido, síntoma que se conoce como maceración. En frutas y verduras, las sustancias pécticas constituyen un factor determinante de la textura y firmeza, y por tanto de la calidad del producto. De hecho, el ablandamiento característico de las frutas al alcanzar la madurez se debe al aumento de las enzimas pectinolíticas, que está controlado fisiológicamente por la planta. (Pagan, 1998)

Tal como se han definido, las pectinas son sustancias, en términos prácticos, solubles en agua. No obstante, es frecuente que los residuos de ácido galacturónico se encuentren metilados en mayor o menor grado. El grado de metilación afecta a diversas propiedades de las pectinas, incluyendo su solubilidad

en agua, la cual es inversamente proporcional al grado de metilación (Pagan, 1998).

La utilización de soluciones ácidas diluidas para la extracción de pectinas debe ser cuidadosamente controlada, debido al peligro de hidrólisis. El uso de soluciones acuosas de agentes gelantes se debe a la capacidad de éstos de eliminar el calcio. Este catión divalente juega un importante papel en la estabilización de pectinas debido a su capacidad de formar puentes entre dos residuos cargados negativamente y situados en cadenas distintas (Pagan, 1998).

2.2.3 Utilización y Contenido en los Alimentos

Una de las aplicaciones principales de las pectinas se debe a la capacidad de estas moléculas de formar geles en determinadas circunstancias. Las pectinas de bajo metoxilo pueden formar geles en presencia de calcio, mientras que las de alto metoxilo gelifican a pH ácido (de modo que la repulsión electrostática entre los grupos ácido sea mínima) y en presencia de una concentración elevada de azúcar (que contribuye a deshidratar la solución). Estos geles son de uso frecuente en mermeladas, confituras y conservas de frutos. En otros casos, la aplicación consiste justamente en la eliminación de sustancias pécticas de un producto. La clarificación de zumos, esto es, la eliminación enzimática de pectinas en forma coloidal, constituye un ejemplo típico (Pagan, 1998).

Las pectinas son sustancias abundantes en los vegetales, constituyen aproximadamente el 35% de la pared celular vegetal en dicotiledóneas (Pagan, 1998).

Tabla 1. Contenido de pectina en las frutas y verduras (Pagan, 1998)

Fruta o verdura	Pectina Total (%)
Manzana	0.47
Fresa	0.52
Frambuesa	0.36
Zanahoria	1
Patata	0.36
Brócoli	0.51

2.2.4 Estructura

El término pectinas incluye un grupo relativamente heterogéneo de moléculas como polisacáridos ácidos y neutros, principalmente ramnogalacturonano, arabinano, galactano, arabinogalactano, homogalacturonano y ramnogalacturonano (Pagan, 1998).

El ramnogalacturonano (RGI) es la molécula más representativa y abundante del grupo, siendo el componente principal de las dicotiledóneas. Está formado por una cadena lineal de residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces glicosídicos α 1,4 en la cual se intercalan moléculas de ramnosa mediante enlaces α (1-2). El RGI contiene un cierto número de cadenas laterales formadas por arabinosa y galactosa (Pagan, 1998).

El arabinano es una molécula muy ramificada que contiene una cadena principal de arabinosas unidas por enlaces α (1-5) con cadenas laterales de una sola arabinosa, unidas a la cadena principal (Pagan, 1998).

El galactano y arabinogalactano son generalmente componentes minoritarios, aunque en algunos casos, por ejemplo en cotiledones de judía pueden ser abundantes. El primero está formado por una cadena lineal de galactosas unidas por enlaces (1-4). El segundo consta de una cadena principal de galactosa (1-4) con cortas cadenas laterales de arabinosa α (1-5) unidas al carbono 3 de la galactosa (Pagan, 1998).

2.2.5 Proceso de Extracción.

2.2.5.1 Selección del material

En este paso se debe tener en cuenta la calidad del material vegetal que se ha de utilizar, es decir material sin hongos, sin partes putrefactas y el nivel de maduración del vegetal, ya que el material sin madurar tiende a contener un mayor porcentaje de pectinas (Devia, 2003).

2.2.5.2 Inactivación de las enzimas pécticas

Enzimas pectinolíticas, son metabolitos extracelulares producidos por algunos microorganismos (levaduras y hongos principalmente) como el *Bacillus pumilus* 29 (Cabeza, 2003). Estas enzimas se usan principalmente en la industria productora de jugos, se denominan enzimas pectinolíticas aquellas que utilizan como sustrato natural compuestos pécticos (Yegrs, 2001).

Con el fin de hacer más eficiente el proceso de extracción, es necesario inhibir la actividad enzimática de las enzimas pécticas, además de eliminar suciedades y/o microorganismos presentes en el material seleccionado. La inactivación se realiza llevando a ebullición una mezcla del material vegetal molido y agua (Devia J, 2003).

2.2.5.3 Hidrólisis Acida

El proceso de extracción de pectinas es una hidrólisis ácida, para la cual existen dos métodos. El método abierto que consiste en el calentamiento de la solución de material vegetal (molido), algún ácido y agua en agitación y en un recipiente abierto a la atmósfera. El método cerrado consiste en el calentamiento de la misma solución anterior en un recipiente en con un condensador acoplado (Devia, 2003).

El tiempo de calentamiento es una variable crítica en el proceso de extracción al igual que la temperatura (Pagan, 1998).

Los ácidos que se usan normalmente en este proceso de extracción son ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido nítrico o ácido clorhídrico (Devia, 2003).

2.2.5.4 Filtración de residuos

Una vez cumplido el proceso de hidrólisis se filtra el material con ayuda de un cedazo, con el fin de separar el sólido y la solución líquida (Devia, 2003).

2.2.5.5 Precipitación

La etapa siguiente se basa en la separación de la pectina de la solución ácida, para lo cual se emplean sales o alcoholes (preferiblemente estos últimos, ya que las pectinas se usan en la industria de alimentos). En esta precipitación se recomienda utilizar un volumen de alcohol equivalente al 80% de la solución que se va a precipitar (Devia, 2003).

2.2.5.6 Secado

El proceso de secado se debe realizar a una temperatura aproximada de 40 °C durante un tiempo de 12 horas o al aire libre durante varios días (Devia, 2003).

2.2.5.7 Determinación del grado de esterificación de la pectina.

Las pectinas se clasifican en pectinas de alto o de bajo metoxilo dependiendo del grado de esterificación. Se dice que una pectina es de bajo metoxilo (de manera arbitraria) si su grado de esterificación se encuentra entre 40 y 59%; se clasifican de alto metoxilo cuando la pectina tiene un grado de esterificación mayor a 60% (Pagan, 1998).

La característica más importante de la pectina es el poder de gelación, ya que esta característica indica la capacidad del producto de formar geles y es la que define la clase de pectina, “ultra rapid set”, “rapid set”, “Medium rapid set” o “slow set”. Esta definición se fundamenta en la relación de una estructura incipiente de jalea gelífica (forma un semisólido a una temperatura de gelación determinada). El poder de gelación es directamente proporcional al grado de metoxilación de la pectina (Pagan, 1998).

Tabla 2. Características de las pectinas (Pagan, 1998)

Características	Ultra Rapid Set	Rapid Set	Medium Rapid Set	Slow Set
% de esterificación	74-95	71-74	66-70	58-65
Formación de gel (minutos)	3-5	4-8	15-25	30-120
pH de gelificación óptimo	3,1-3,4	3,0-3,3	2,8-3,1	2,6-2,9
pH de disolución al 1%	2,9-3,5	2,9-3,5	2,8-3,5	2,8-3,5
Cenizas totales (%)		5		
Pérdida por secado (%)		aprox. 12		
Arsénico (ppm) menos de		3		
Plomo (ppm) menos de		10		
Cobre (ppm) menos de		60		
Gémenes patógenos		ausencia		
Gémenes totales por gramo		menos de 1000		
Aspecto		polvo fino de color crema		
Granulometría		rechazo inferior al 1% en tamiz de abertura 0,31 micra		

2.2.5.8 Determinación de la viscosidad intrínseca de muestras de pectina.

Las viscosidades intrínsecas se determinan midiendo 6 tiempos de flujo de soluciones de pectina de una misma muestra a 4 concentraciones distintas a 30°C en el viscosímetro capilar. El disolvente es una disolución acuosa que contiene EDT sal sódica 5 mM y NaCl 0,155 M. con el pH ajustado a 5. Se obtiene la densidad de cada concentración a 30°C mediante picnómetro y a partir de estos valores se determina la viscosidad de la dispersión mediante la expresión.

$\eta = k \cdot t \cdot d$ (Ecuación 1) (Pagan, 1998), donde:

η la viscosidad en mPa•s

k la constante del viscosímetro capilar a 30°C

t el tiempo de flujo en segundos

d la densidad de la disolución en kg/L

Una vez obtenido el valor de η , se determina la viscosidad específica mediante:

$\eta_{sp} = (\eta / \eta_{agua}) - 1$ (Ecuación 2) (Pagan, 1998) donde:

η_{sp} la viscosidad específica (adimensional)

η la viscosidad de la solución en mPa•s

η_{agua} la viscosidad del agua, en mPa•s.

Se determina la constante del viscosímetro sólo con agua destilada, y se grafica η vs. Concentración, el valor de la ordenada en el origen corresponde al parámetro viscosidad intrínseca de la muestra (Pagan, 1998).

2.3 ANTECEDENTES

La información que existe respecto a pectinas es bastante amplia, principalmente se encuentran estudios realizados sobre su extracción a partir de diferentes materias primas vegetales como limón, naranja, plátano, maracuyá, manzana, café, cacao entre otros. De la pectina extraída a partir del cacao la información no es tan abundante como la que existe de otras frutas, lo cual causa un mayor interés en realizar esta investigación.

La abundante información respecto a la extracción de pectinas y de sus usos demuestra la importancia que tiene este compuesto orgánico en la industria (alimenticia principalmente). La gran variedad de materias primas para su obtención y la diferencia en las metodologías implementadas para la misma dan fe de la posibilidad de ampliar el estudio sobre el tema.

Entre la información consultada estos son unas de las investigaciones realizadas más relevantes para nuestra investigación:

RATTONJI D, NORMAN, 1928, Departamento de Bioquímica, Universidad de Birmingham, Inglaterra:

Extracción de pectinas a partir de plantas diversas mediante una precipitación con pectato de calcio después de una hidrólisis básica. Se obtuvieron tres tipos de pectina clasificadas como: Pectosa (insoluble en agua), Pectina (soluble en agua) y Pectina Acida (insoluble en agua). Algunos de los porcentajes de pectina, dependiendo la materia prima, fueron: Granos de cereal (2%) y altos porcentajes (no reportados) para la naranja y el limón.

J. BARRETT, D. H. NORTHCOTE, 1965, Departamento de Bioquímica, Universidad de Cambridge, Inglaterra:

Extracción de pectinas a partir de la manzana mediante precipitación con etanol. Se obtuvo una pectina compuesta en un 13% de monosacáridos neutros y un 87% de monómeros del ácido galacturónico como: arabinosa, galactosa, xilosa y ramnosa.

D. A. REES, N. J. WIGHT, 1969, Departamento de Química, Universidad de Edinburg, Inglaterra:

Caracterización de polisacáridos de pectina mediante análisis de metilación. El análisis permitió conocer el contenido de los polisacáridos de pectina en los cuales fue posible detectar con una cromatografía de papel compuestos como: galactosa, metilramnosa, arabinosa, xilosa y algunas trazas de azúcares metiladas.

DANIEL ADOMAKO, 1972, Cocoa Research Institute, Ghana:

Extracción ácida de pectina de alto metoxilo, a partir del cacao. La pectina obtenida presentó características similares a la pectina de manzana. El rendimiento obtenido fue de 8-11% para la cáscara madura y 25-29% para la fruta verde.

JORGE ENRIQUE DEVIA, 2003, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Colombia:

Producción de pectinas a partir de la cáscara de naranja valencia mediante hidrólisis acida y precipitación con alcohol etílico. La pectina obtenida presentó una buena apariencia con capacidades de gelación comparables al estándar comercial. El rendimiento obtenido en el proceso fue del 10% para un pH cercano a 2 y un tiempo de hidrólisis entre 30 y 40 minutos.

N, GAVIRIA, L. LOPEZ, 2005, Universidad EAFIT, Colombia:

Estudio realizado a partir del maracuyá, en el cual se compara el método convencional con otro denominado “arrastre de vapor”, en el cual se realiza un arrastre de vapor antes de la hidrólisis ácida. Esta hidrólisis se realizó con ácido cítrico y ácido clorhídrico, presentando un aumento del 15% en el rendimiento para este último. Para el análisis de resultados se uso la metodología “Multinivel factorial”.

S. WANG, F. CHENG, J. WU, Z. WANG, X. LIAO, X. Hu, 2005, China Agricultural University, China:

Utilizan una extracción asistida por microondas a partir de pulpa de manzana deshidratada. En la investigación se usaron como variables independientes el tiempo de extracción, el pH de la solución de ácido clorhídrico, la relación sólido líquido y la potencia de las microondas. A su vez la variable de respuesta fue el rendimiento de extracción (se usó la metodología de superficie de respuesta para optimizar los parámetros a controlar). Se obtuvo un rendimiento optimizado de 0.157 gramos de pectina por cada gramo de pulpa deshidratada, Los valores por variable fueron 20.8 min de tiempo de extracción, pH de 1.01, relación sólido líquido de 0.069 y un potencia del microondas de 499.4 Watts.

S. BOLAÑOS, L. SIERRA, 2006, Universidad EAFIT, Colombia:

Usando los residuos del beneficio del café (mucílago y pulpa) se realizó una extracción de pectina mediante el método convencional a escala de laboratorio,

obteniendo rendimientos de 4% (base seca) y 10% (base húmeda) de la pulpa y del mucílago respectivamente.

E. PINHEIRO, I. SILVA, L. GONZAGA, E. AMANTE, R. TEÓFILO, M. FERREIRA, R. Amboni, 2008, Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil:

El diseño de experimentos (metodología de superficie de respuesta) de esta investigación fijó como variables independientes la concentración de ácido cítrico (0.086 – 2.91% peso sobre volumen) y el tiempo de extracción (17-102 min). La variable de respuesta fue rendimiento de la pectina.

La materia prima utilizada fue la fruta “maracuyá”; las condiciones óptimas de las variables de respuesta fueron 0.086 w/v de ácido cítrico y 60 minutos de tiempo de extracción.

R. VASQUEZ, L. RUESGA, R. D’ADDOSIO, G. PÁEZ, M. MARÍN, 2008, Facultad de ingeniería Universidad de Zulia, Venezuela:

Estudio realizado en Venezuela con enfoque en cero emisiones, se hizo la extracción de pectina a partir de la cáscara de plátano clon hartón. Se realizó la extracción mediante hidrólisis ácida con ácido clorhídrico en soluciones con pH de 2 y 3 durante 60 minutos a temperatura de 85°C. En esta investigación se obtuvo pectina de bajo grado de metilación y de un poder de gelación bajo.

O. KURITA, T. FUJIWARA, E. YAMAZAKI, 2008, Mie Prefectural Science and Technology Promotion Center, Japón:

Investigación realizada a partir de la cáscara de la mandarina en presencia de ácido cítrico a diferente pH y temperatura. Se observa que mientras más neutra la solución más disminuye la viscosidad y que mientras más alta la concentración del ácido más se inhibe la acción de la metilestereasa.

M. MASMOIDI, S. BESBES, M. CHABOUNI, C. ROBERT, M. PAQUOT, C. BLECKER, H. ATTIA, 2008, Ecole Nationale d’Ingénieurs de Sfax, Francia:

Optimización del proceso de extracción, en la cual se utilizó la metodología de superficie de respuesta como modelo matemático; se controlaron las variables temperatura, pH y tiempo de extracción. Los resultado óptimos del experimentos arrojaron: 3 hora s 34 minutos de tiempo de extracción a 84.34 °C y a un pH de 2.9; se obtuvo un rendimiento de 11.21%.

A.SCABIO, H. FERTONANI, M. SCHEMIN, C. PETKOWICZ, E. CARNEIRO, A, NOGUEIRA, G WOSIACKI, 2007, Brazilian Journal of food technology, Brasil:

La investigación surge a partir de la cantidad de manzana deshidratada resultante de la producción de 250.000 toneladas métricas en Brasil. Los estudios se realizaron bajo diferentes parámetros de extracción; tiempos entre 3 y 37 minutos, temperaturas entre 63 y 97°C y concentraciones de ácido cítrico desde 8 hasta 92 mM.

3. METODOLOGÍA

En este proyecto se diseñó un proceso a escala de laboratorio con el fin de extraer pectinas a partir de la mazorca de cacao, teniendo como principio definir la pectina de interés con base en los mayores valores de las variables de respuesta seleccionadas (rendimiento y grado de esterificación). Luego de analizar los resultados obtenidos con la mazorca, se realizaron las pruebas con la cascarilla con las condiciones óptimas de la mazorca.

Todos los ensayos se realizaron en el centro de laboratorios de la Universidad EAFIT.

Para alcanzar este objetivo se empleó la siguiente metodología:

Etapa 1: Revisión bibliográfica del tema.

Se realizó una búsqueda de información con base en fundamentos científicos para el para el desarrollo del proyecto.

Etapa 2: Obtención de las muestras.

Las muestras de la mazorca del cacao se compraron en una finca cacaotera, ubicada en San Jerónimo Antioquia y la muestras de cascarilla fueron donadas por la Cia. Nacional de Chocolates.

Etapa 3: Montaje del proceso de extracción.

Se realizó el proceso de extracción general usando equipos a escala de laboratorio como beakers, licuadora, planchas de calentamiento, centrífuga, estufa, pHmetros, etc.

Etapa 4: Montaje de técnicas analíticas.

Se empleó la espectroscopia infrarroja, poder de gelación y la prueba de Schultz (Shultz, 1965) para determinar el grado de esterificación.

Etapa 5: Ensayos preliminares.

Teniendo en cuenta que los procesos de extracción tienen gran número de variables, se realizaron ensayos preliminares con el fin de definir las variables independientes (pH, tiempo de hidrólisis, tiempo de cocción, concentración del solvente, temperatura de secado) que más afecten las variables de respuesta rendimiento y grado de esterificación. Con base en estos ensayos se definieron los factores pH, tiempo de hidrólisis, tiempo de cocción y los niveles en los que los factores se movieron.

Etapa 6: Ensayos experimentales.

Los ensayos se realizaron en los laboratorios de la Universidad EAFIT, ubicada en la ciudad Medellín. Estos ensayos se guiaron bajo un diseño de experimentos factorial 2^k con punto en el centro (Pulido y De la Vara, 2003). Para este diseño se emplearon pH, Th y Tc como factores cada uno evaluado en 2 niveles y en su respectivo punto medio.

Etapa 7: Diseño del Proceso.

Con base en el conocimiento adquirido en el desarrollo de las etapas anteriores se plasmó el diseño del proceso de extracción y purificación de la pectina usando como herramienta un diagrama de bloques (PDF) (Turton R, 2003).

Etapa 8: Análisis económico preliminar.

Se realizó un análisis económico a partir de los resultados obtenidos durante la investigación con el fin de evaluar la viabilidad económica del proyecto.

Etapa 9: Elaboración del informe final.

Se analizaron los resultados y posteriormente el informe final los datos obtenidos en la investigación.

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS

A continuación se presenta el listado de los materiales y equipos que fueron empleados para el desarrollo de esta investigación.

3.1.1 Reactivos y Material vegetal

- Agua desionizada.
- Alcohol etílico al 96% Bellchem
- Ácido clorhídrico al 10 N Bellchem
- Hidróxido de sodio en escamas Bellchem.
- Pectina “rapid set” Cp Kelco.
- Cascarilla de la almendra del cacao.
- Fruto de cacao.

3.1.2 Equipos

- Plancha de calentamiento, Corining, PC 420.
- pHmetro, Metrohm, 28173.
- Balanza electrónica, OHAUS, TS 600.
- Licuadora, Oster, classic.
- Centrifuga, Hettich, Universal 16.
- Horno, Heraeus, TU 250.
- Mufla, Terrígeno, 08.
- Espectrofotómetro infrarrojo, FT-IR System.
- Beaker de 2 L, Boeco.

- Agitador magnético, Corning.
- Pipeta 10 mL, Brand.
- Termómetro, Brand.
- Buretas 50 mL, Brand.

3.2 PROCEDIMIENTO DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL.

3.2.1 Preparación del material:

Se pesaron 200 gramos de material sólido en una báscula marca OHAUS, se lavó con agua para eliminar excesos de suciedad, y luego se cortó en trozos pequeños para facilitar el licuado. Se licuó junto con 500 mL de agua empleando una licuadora Oster su máxima velocidad durante 3 minutos.

3.2.2 Cocción:

La mezcla se sometió a un proceso de cocción a una temperatura de 95 ° utilizando un beaker y una plancha de calentamiento marca CORNING. Este procedimiento tuvo como fin inhibir la acción de las enzimas pécticas presentes en el material, especialmente la pectinasa (enzima degradante de la pectina), además de microorganismos presentes en el material seleccionado. Una vez cumplido el tiempo de cocción se introdujo el beaker con la mezcla en un recipiente con agua fría evitando extender el tiempo determinado para el ensayo.

Figura 2. Cocción del material vegetal



3.2.3 Ajuste de pH:

Se ajustó el pH de la mezcla a los niveles establecidos (1.5, 2.5) empleando un medidor de pH digital marca Metrohm y ácido clorhídrico al 10% N.

3.2.4 Hidrólisis ácida:

Una vez fijado el pH, la mezcla se sometió a un proceso de hidrólisis ácida a una temperatura de 80°C empleando una plancha de calentamiento. Una vez cumplido el tiempo de extracción se introdujo el beaker con la mezcla en agua fría cortando rápidamente la reacción evitando sobrepasar el tiempo establecido para la misma.

Figura 3. Hidrólisis ácida



3.2.5 Filtración:

La mezcla hidrolizada se filtró a través de una tela fina, separando el material sólido de la fase líquida en la cual se encontraba disuelta la pectina.

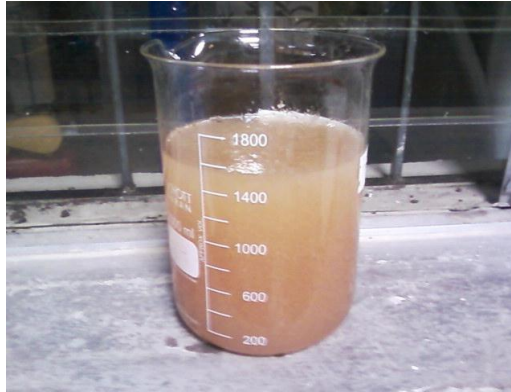
Figura 4. Filtración con cedazo de muselina



3.2.6 Precipitación:

La fase acuosa resultante de proceso de filtrado se precipitó utilizando etanol comercial al 96%. La cantidad empleada de este último corresponde al 80% del volumen de filtrado obtenido, el cual fue, en promedio, de 400 ml.

Figura 5. Precipitación



3.2.7 Separación:

Se separó la pectina precipitada utilizando un centrifuga marca Hettich. Luego de la separación se obtiene la pectina (húmeda) y una mezcla etanol-agua. El etanol obtenido luego de dicha separación se recuperó mediante destilación.

3.2.8 Purificación:

Con el fin de eliminar impurezas y trazas de HCl que afecten la solubilidad y el aspecto de la pectina, se llevó a cabo un proceso de purificación. El proceso consta de los siguientes pasos:

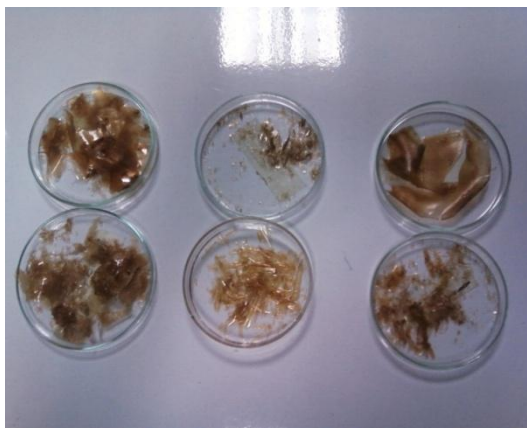
- Se disolvió nuevamente en un beaker con 300 ml de agua la pectina obtenida en la primera centrifugación.
- Se centrifugó y recuperó el sobrenadante en el cual se encuentra disuelta la pectina.

- Se precipitó la pectina disuelta utilizando etanol comercial al 96 % y empleando la misma relación de volumen de la primera precipitación.
- Se centrifugó nuevamente la pectina purificada.

3.2.9 Secado:

La pectina se secó en una estufa marca Heraeus a una temperatura de 40°C por 24 horas. Luego se esparció de manera uniforme sobre un vidrio de reloj previamente pesado con el fin de determinar la cantidad de pectina obtenida mediante la diferencia entre el peso final e inicial.

Figura 6. Pectinas purificadas



3.2.10 Rendimiento:

Los rendimientos reportados se calcularon en base seca. Se realizaron 5 ensayos de deshidratación de la mazorca del cacao con el fin de determinar el peso seco en 200 g iniciales de material sólido.

Los resultados de estos ensayos se muestran a continuación:

Tabla 3. Porcentaje de humedad de las mazorcas de cacao

Contenido de Humedad (%)	
Ensayo 1	83
Ensayo 2	85
Ensayo 3	80.2
Ensayo 4	80.4
PROMEDIO	82.15

De acuerdo a los resultados obtenidos se estableció un contenido de humedad para la cáscara del cacao del 82%. Con base en esto se calculó el contenido de material sólido en 200 gramos de materia prima, así:

$$200gr * (1 - 0.82) = 36gr \text{ (Ecuación 3)}$$

El rendimiento de todos los ensayos exceptuando el realizado con la cascarilla (debido a que la cascarilla es sometida a 250°C en el proceso de tostión durante el beneficio del cacao, gracias a esto queda deshidratada), se calculó de la relación:

$$rendimiento = \frac{gr.pectinaobtenidos}{36grmaterialseco} * 100 \text{ (Ecuación 4)}$$

3.2.11 Determinación del grado de esterificación:

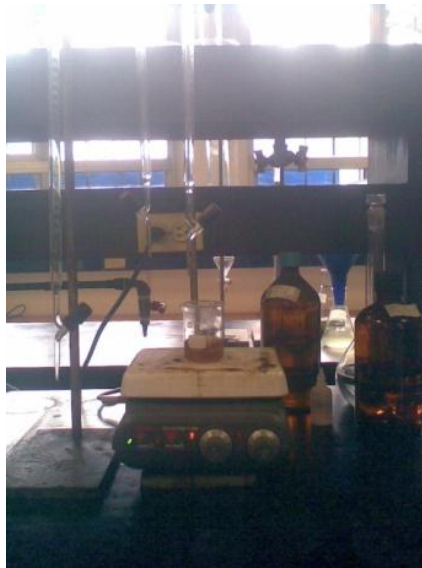
Se preparo una solución 1% de pectina con agua. Se tituló dicha solución con NaOH 0.1028N utilizando fenolftaleina como indicador. La cantidad de NaOH empleada en esta titulación se denominó "A".

Luego se agregaron 20 ml de NaOH al 0.4715 N y se dejó en agitación y a temperatura ambiente durante 30 minutos con el fin de desesterificar completamente la pectina, pasado este tiempo se vertieron 20 mL de HCL al 0.4809 N para neutralizar la solución, por último se tituló nuevamente con NaOH al 0.1028 N. Esta cantidad se denominó "B".

Grado de metoxilacion o esterificación (Shultz, 1965):

$$DE = \frac{B}{A+B} * 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Figura 7. Titulación



3.2.12 Contenido de cenizas:

Se calcina en una mufla a 600°C 1 gramo (peso inicial, *Pin*) de pectina durante 4 horas: se pesa el resultado de la calcinación y se determina el contenido de cenizas con la relación (Cready, 1970):

$$C.C = \frac{Pf}{Pin} * 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

3.2.13 Espectroscopia de Infrarrojo:

El espectro infrarrojo de una sustancia química es como su “huella digital” ya que cada sustancia absorbe cierta cantidad de energía en determinadas longitudes de onda al está ser irradiada con radiación infrarroja. Este espectro se construye graficando Transmancia vs. Longitud de onda (Torre, 2005).

A continuación se presentan los picos característicos de la pectina en cm^{-1} .

- C=O del éster: 1730-1760 cm^{-1}
- C=O del ácido: 1600-1640 cm^{-1}
- C-H: 1380 cm^{-1}
- C-O: 1000-1300 cm^{-1}
- -OH: 3300-3400 cm^{-1}

3.2.14 Poder de Gelación:

La prueba para hallar el poder de gelación de la pectina experimental no pudo ser realizada pues no fue posible conseguir el Ridgelímetro, equipo empleado para este fin.

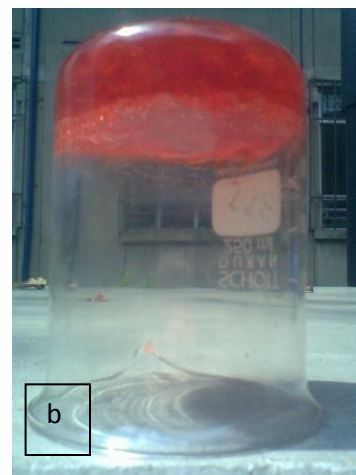
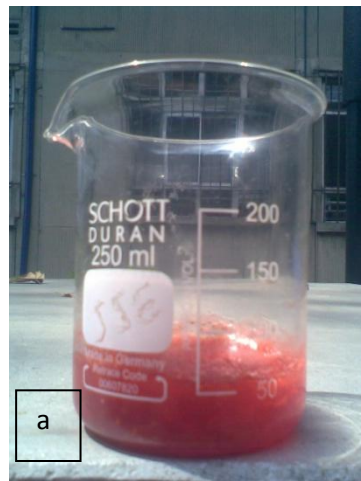
Sin embargo, con el fin de analizar la capacidad de gelación de las pectinas obtenidas se realizó una prueba de tiempo de gelación (setting time), mediante la fabricación de una mermelada de fruta, mezclando los componentes que aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Proporciones para obtener 100 gr. de mermelada.

Componente	%
Fruta	50%
Azúcar	45%
Pectina	0.50%
Agua	4.50%
Acido cítrico	0.05%

Para determinar el tiempo de gelación se siguieron los siguientes pasos: 1) Dispersar mecánicamente la pectina en el azúcar. 2) Agregar todos los sólidos al agua y calentar para disolver la pectina. 3) Ajustar el pH con ácido cítrico, por último y por último se dejó enfriar.

Figura 8. Resultados "Setting time",



En la figura 8, se observa la mermelada gelada con la pectina obtenida.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Luego de una búsqueda bibliográfica se establecieron como variables de respuesta para el proceso de extracción de pectinas del cacao, el rendimiento de pectina obtenida y el grado de metoxilación de esta y como variables del proceso (factores), el tiempo de hidrólisis, pH y tiempo de cocción. La razón por la cual se escogió el rendimiento como variable de respuesta se fundamenta en poder relacionar la cantidad de pectina obtenida con las demás cantidades de reactivos y materia prima utilizadas en el proceso, y de esta forma poder establecer la viabilidad económica del mismo. El grado de metoxilación aparece en las variables de respuesta puesto que es la característica principal de las pectinas que determina su calidad.

Respecto a las variables de extracción se encontró que la relación entre el tiempo de hidrólisis y el pH de la solución es determinante en la calidad de las pectinas, mientras que el tiempo de cocción juega un papel importante neutralizando enzimas y microorganismos perjudiciales, además del ablandamiento del material que facilita la extracción posterior.

4.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Se evaluaron los 2 niveles (ver tabla 5) para los factores tiempo de cocción, pH y tiempo de hidrólisis, con el fin de determinar cómo influyeron sobre las variables de respuesta rendimiento y grado de esterificación. Cabe recordar que el diseño de experimentos factorial 2^K (Pulido y De la Vara, 2003) se planteó exclusivamente para el proceso que utiliza mazorca del cacao como materia prima. Para el análisis de resultados se utilizó el software Minitab (ver anexos I y II).

Tabla 5. Factores y niveles del diseño de experimentos.

Factores	NIVEL -1	NIVEL 1
Tiempo de cocción (Tc o A) (min)	20	30
Tiempo de hidrólisis (Th o B) (min)	20	40
pH antes de hidrólisis (pH o C)	1.5	2.5

4.1.1 Análisis de resultados de la pectina obtenida a partir de la mazorca de cacao

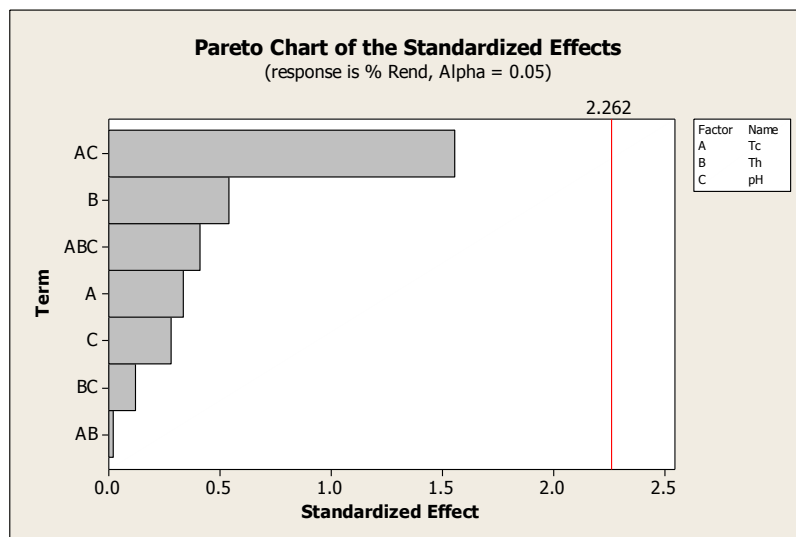
La nomenclatura usada en el diseño fue A, Tiempo de cocción (Tc) en minutos; B, Tiempo de hidrólisis (Th) en minutos; C, pH; Rend, Rendimiento (%); G.M, Grado de metoxilación o esterificación (%). En la siguiente tabla se presentan los resultados ordenados de la siguiente manera según la numeración: del 1 al 8 son los ensayos iniciales, del 9 al 16 son las réplicas de los ensayos iniciales y los numerales 17 y 18 corresponden al ensayo inicial en el punto medio y a su réplica.

Tabla 6. Resultados de los ensayos

#	Tc	Th	pH	% G.M	% Rend
1	20	20	1.5	78.43	3.33
2	30	20	1.5	82.14	1.92
3	20	40	1.5	71.64	4.22
4	30	40	1.5	79.22	1.89
5	20	20	2.5	82.26	2.06
6	30	20	2.5	84.13	2.08
7	20	40	2.5	71.93	1.81
8	30	40	2.5	76.92	3.72
9	20	20	1.5	77.36	2.81
10	30	20	1.5	75	1.97
11	20	40	1.5	72.58	2.14
12	30	40	1.5	81.82	3.06
13	20	20	2.5	78.18	2.03
14	30	20	2.5	82.72	3.56
15	20	40	2.5	75.41	3.06
16	30	40	2.5	78.26	1.94
17	25	30	2	95.45	5.39
18	25	30	2	91.84	3.39

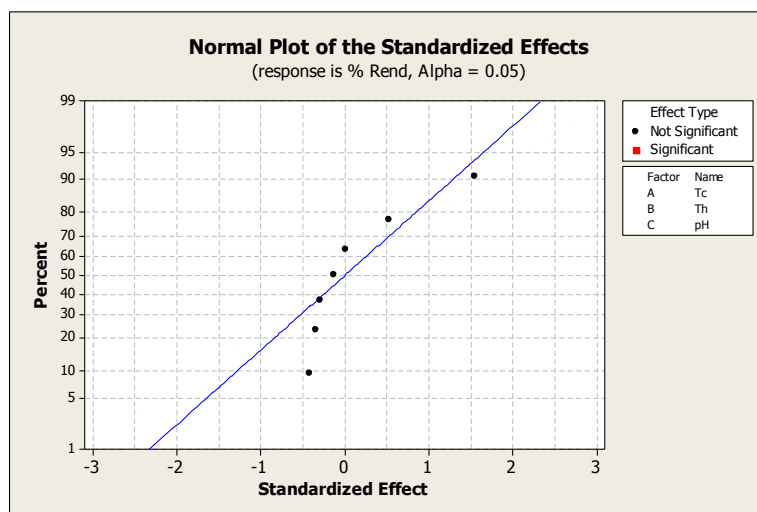
4.1.1.1 Análisis general para la variable rendimiento

Figura 9. Diagrama de Pareto para rendimiento.



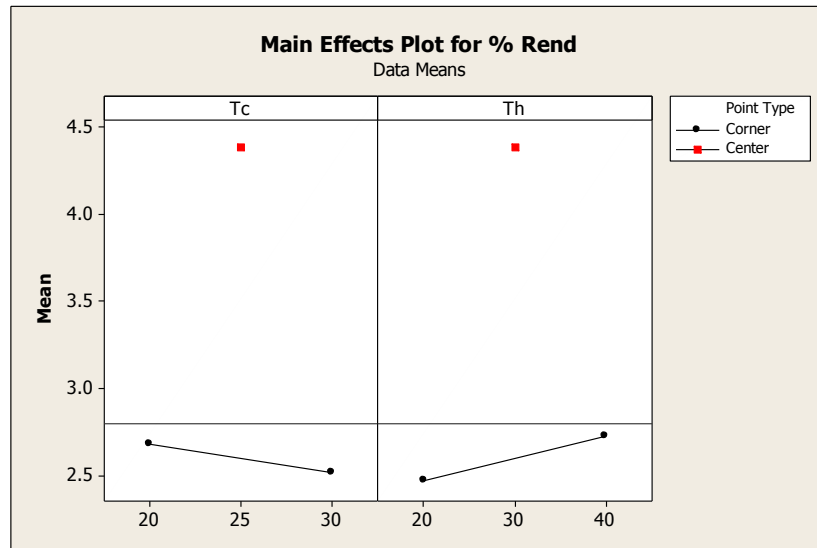
Se observa en la figura 9 que el efecto de ninguno de los factores y sus respectivas interacciones sobrepasa la línea de referencia, lo cual indica que ninguno de los efectos es significativo sobre la variable de respuesta que es "Rendimiento", claro que entre estos se podría decir que existe una ligera interacción entre los factores Th y pH.

Figura 10. Diagrama de efectos normal para rendimiento.



En la figura 10 se observa que los efectos están muy cerca de la línea de referencia o efecto cero, lo que corrobora lo observado en figura 9 acerca del poco efecto (positivo o negativo) de estos factores sobre la variable “Rendimiento” en los niveles estudiados.

Figura 11. Diagrama medias de los niveles vs tiempo para rendimiento.



En la figura 11 se representa el comportamiento de la variable “Rendimiento” en los niveles estudiados para los factores tiempo de cocción (Tc) y tiempo de hidrólisis (Th), sólo se realiza el análisis de estos dos factores ya que el factor pH no presentó interacción significativa. Puede apreciarse que en ninguno de los factores se presenta un valor de rendimiento por encima de la media general, lo que indica que estos factores no presentan efectos significativos. Además puede observarse que a medida que el tiempo de cocción se aleja de su nivel inferior el valor del rendimiento decrece, mientras que el comportamiento para el tiempo de hidrólisis es opuesto.

Además de lo enunciado anteriormente se observa que para ambos factores el comportamiento del modelo estadístico seleccionado para este diseño presenta curvatura, es decir, el comportamiento de la variable de respuesta no es lineal ya que la media para el “punto medio” está por encima de la media general.

Respecto a que ninguna de las variables estudiadas en sus respectivos niveles presentó un efecto significativo sobre la variable de respuesta “Rendimiento”, podemos pensar en las siguientes causas:

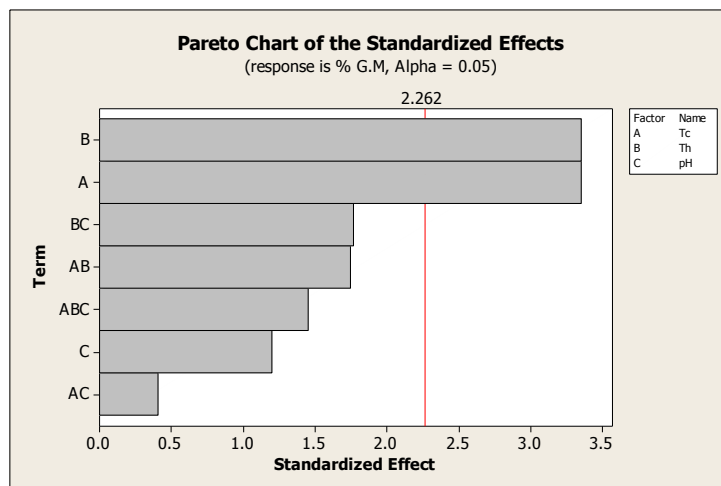
La variable “Rendimiento” no se ve afectada por ninguno de los factores en los niveles establecidos para el diseño de experimentos, esto puede deberse a que los tiempos seleccionados para el tiempo de extracción no fueron lo suficientemente largos para llevar a cabo una extracción apropiada, además de esto, no presentaron un distanciamiento significativo como para presentar una variación en los resultados obtenidos.

El proceso empleado para la extracción de pectinas, estuvo basado en operaciones que requieren manipulación. Ejemplo de esto son las operaciones de filtrado y separación en las cuales la habilidad del investigador juega un papel importante para ser realizadas de manera similar en cada uno de los ensayos. Además de esto, el grado de madurez de los frutos empleados en los experimentos no fue similar lo cual contribuye a generar mayor cantidad de ruido en el diseño.

Otra razón podría ser la enunciada por Panchev (1989) el cual reporta que entre el rendimiento de extracción de pectinas y el tiempo de extracción no existe una correlación lineal. (Pagan J, 1998). Del mismo modo Bolaños y Sierra (2007) reportan en su investigación, referente a la extracción de pectina del café, que la cantidad de ácido empleado en la hidrólisis no influye de manera significativa en el rendimiento obtenido, lo cual sería aplicable en este caso para la variable pH.

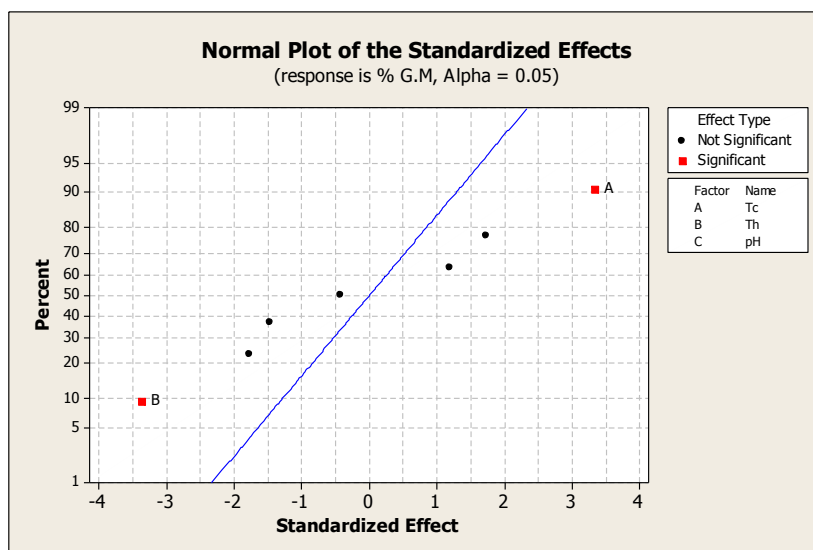
4.1.1.2 Análisis general de la variable “Grado de metoxilación”.

Figura 12. Diagrama de Pareto para Grado de Esterificación.



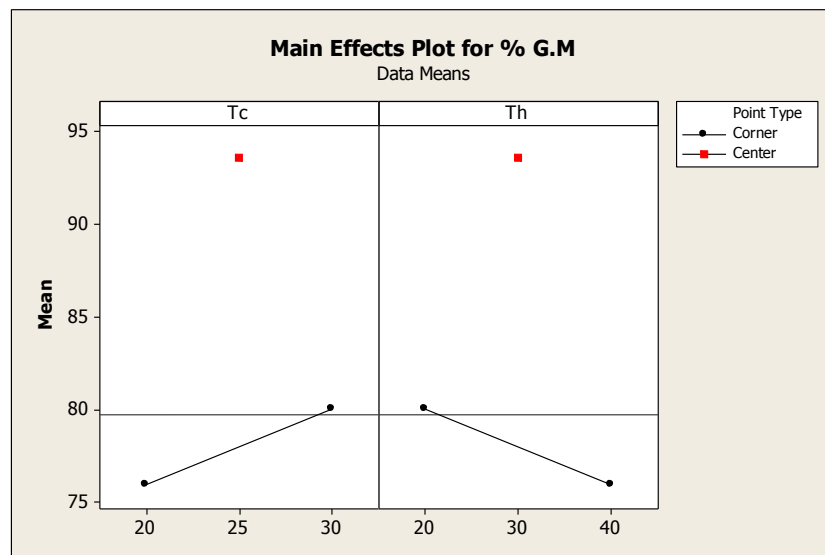
Esta figura muestra los efectos significativos de los factores tiempo de hidrólisis (B) y Tiempo de Cocción (A) sobre la variable de respuesta “Grado de metoxilación”. También da a entender que el factor pH (C) y las interacciones de los factores estudiados no presentan efectos significativos en los niveles estudiados.

Figura 13. Diagrama de efectos normal para Grado de Esterificación.



En esta gráfica se observa que los únicos factores que poseen un efecto significativo sobre la variable de respuesta son el tiempo de cocción y el tiempo de hidrólisis, lo cual es consecuente con lo mostrado en la figura 13. El tiempo de hidrólisis (B) presenta un efecto negativo lo cual indica que al pasar del menor al mayor nivel del factor, la respuesta decrece; mientras que el factor tiempo de cocción (A) presenta un efecto positivo, en cual, al pasar del menor al mayor nivel, la respuesta se incrementa.

Figura 14. Medias de los niveles vs tiempo.



La figura 14 muestra como influyen los factores tiempo de cocción y tiempo de hidrólisis sobre la variable grado de metoxilación. Se observa como ambos factores poseen efectos significativos porque encuentran por encima de la media general.

El factor tiempo de cocción presenta un efecto positivo en los niveles estudiados, lo cual se evidencia en su pendiente positiva; mientras que el tiempo de hidrólisis presenta un efecto negativo como se ve por la inclinación de la pendiente. Este análisis sería equivalente a decir que a mayor tiempo de hidrólisis el grado de esterificación decrece lo que es lógico según la teoría y lo contrario para el tiempo de cocción.

Además de lo enunciado anteriormente se observa que, para ambos factores, el comportamiento del modelo estadístico seleccionado presenta la curvatura similar a la evidenciada en la Figura 11.

El resultado del estudio para la variable grado de metoxilo (G.M), muestra que los factores de mayor efecto sobre la misma fueron el tiempo de cocción y el tiempo de hidrólisis. Este resultado puede deberse a:

La cocción cumplió su función de inhibir la acción de las enzimas pectinolécicas y microorganismos presentes en la materia prima, las cuales degradan protopectinas y pectinas presentes en la pared celular de la biomasa vegetal; esto se ve reflejado en la figura 11 en el cual, a medida que aumenta el tiempo de cocción aumenta el grado de esterificación lo cual, está directamente relacionado con el grado de metoxilación de la pectina, indicando que de alguna manera el polímero no fue afectado estructuralmente por los microorganismos y las sustancias pectinolécicas, antes y durante la hidrólisis.

Si al aumentar el tiempo de cocción aumenta el rendimiento de la pectina y sobretodo el grado de metoxilación, se podría pensar que la protopectina es un polímero de gran tamaño que sólo se rompe a través de los enlaces 1,4'- α glucocídicos, generando moléculas de pectina más pequeñas, por lo tanto hidrosolubles, en las cuales no se ven afectados los grupos éster. Sin embargo, como se evidencia en la figura 6 un aumento desmedido en el tiempo de esta variable genera un menor grado de metoxilación, debido a que la hidrólisis rompe la cadena polimérica por las uniones metil-éster de los monómeros, lo que se ve reflejado en los resultados por el modelo estadístico.

Los resultados arrojados por el modelo factorial con base en los datos experimentales obtenidos indica que el mejor resultado para el grado de metoxilación y el rendimiento fue conseguido en el punto medio, el cual utilizó los valores medios de cada nivel para los factores estudiados, con base en esto se consideró a estas condiciones como las óptimas en este estudio.

4.2 PECTINA OBTENIDA A PARTIR DE LA CASCARILLA DE LA ALMENDRA DE CACAO:

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de la mazorca del cacao se seleccionaron las condiciones del punto medio, para realizar las pruebas experimentales con la cascarilla, ya que solo se pretendía evaluar si esta poseía pectinas.

Condiciones del ensayo:

Tiempo de cocción (min): 25

Tiempo de hidrólisis (min): 30

pH: 2.0

Con estas condiciones se obtuvieron valores de 2.58% y 75.68 % para rendimiento y grado de esterificación respectivamente.

4.3 CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS PECTINAS OBTENIDAS CON LA PECTINA COMERCIAL:

Se realizó la caracterización y comparación de la pectina obtenida en el proyecto con base en la pectina comercial producida por la empresa CP Kelco. Para la comparación se utilizó la ficha técnica del producto y los datos obtenidos para la pectina del ensayo central, en el cual se obtuvo el mejor rendimiento y el más alto grado de metoxilación.

Referencia de la pectina comercial: Pectina tipo 105, "rapid set", importada por la empresa Bellchem de Medellín.

Se realizaron espectros infrarrojos, determinación de porcentaje de cenizas y datos sobre la prueba de poder de gelación de la pectina comercial y las pectinas de referencia, con el fin de determinar principalmente su poder de gelación.

Figura 15. Espectro infrarrojo de la pectina comercial "Rapid set".

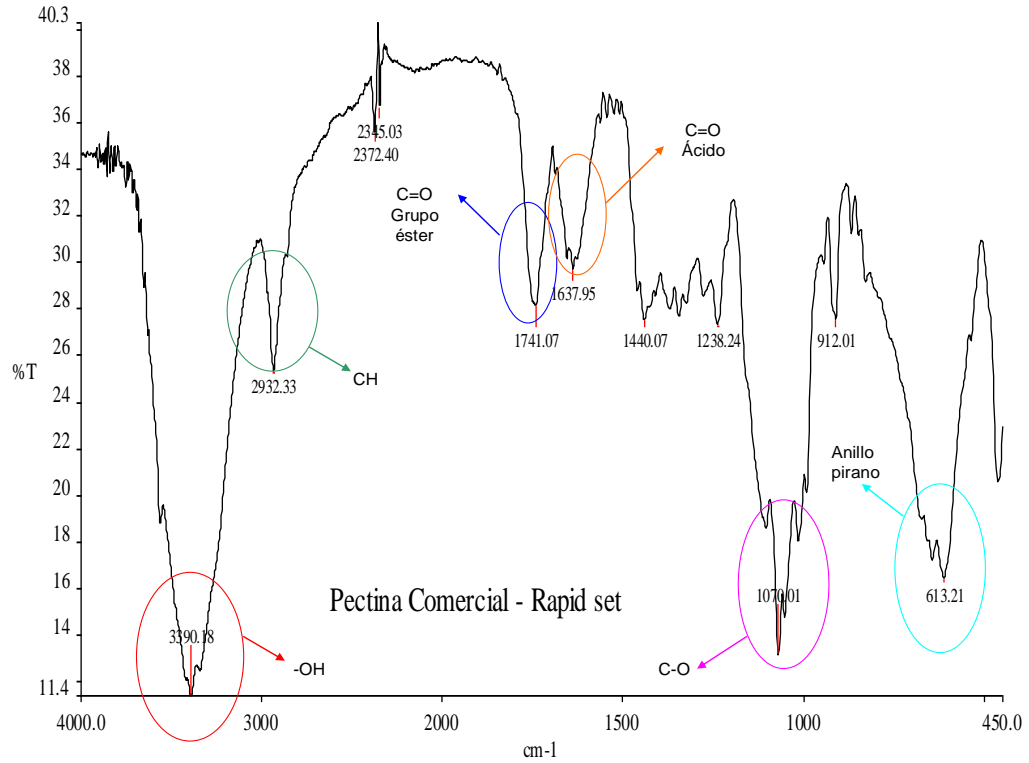


Figura 16. Espectro infrarrojo de la pectina de mazorca de cacao.

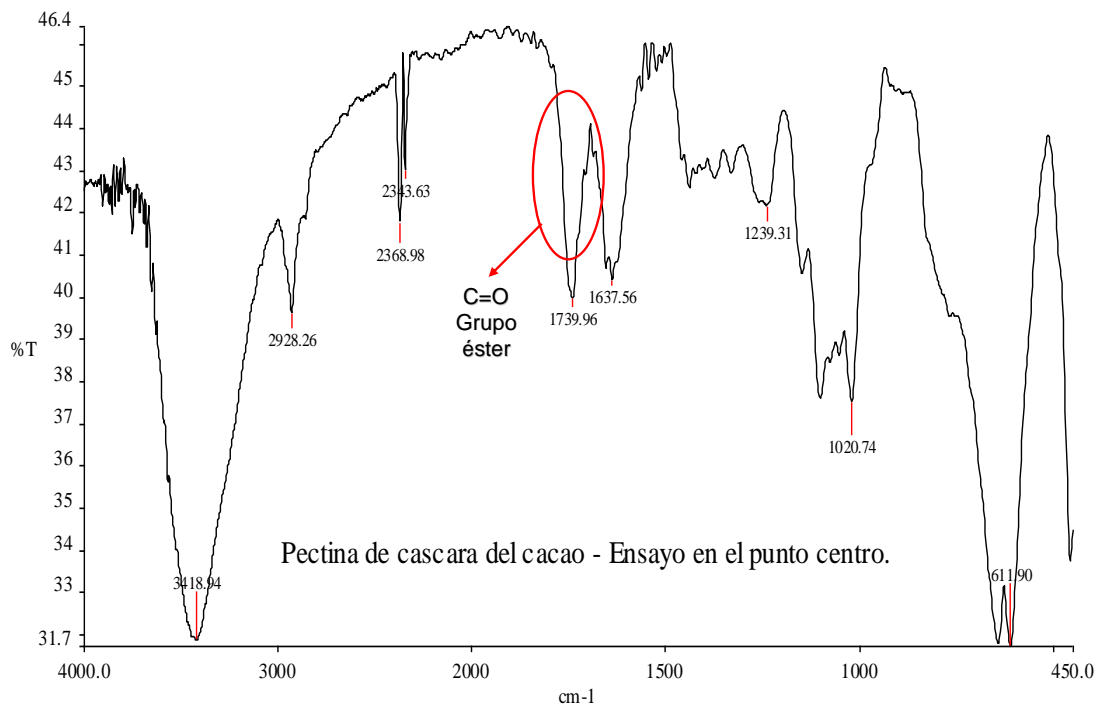


Figura 17. Espectro infrarrojo de la pectina de cascarilla del cacao.

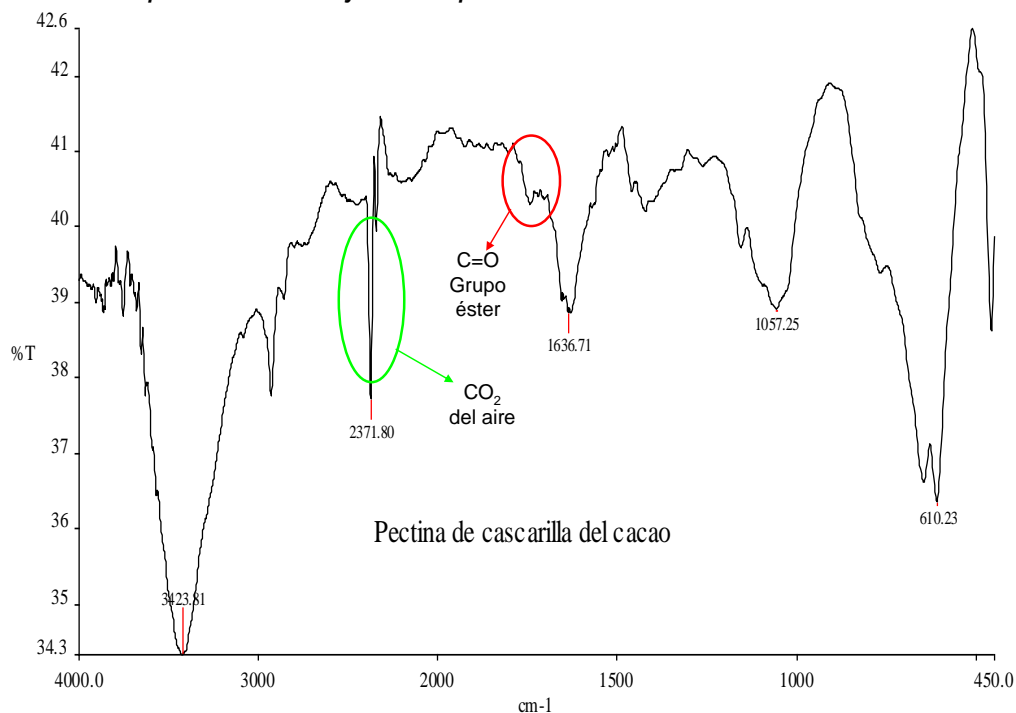


Tabla 7. Comparación de propiedades

PROPIEDADES	Grado de metoxilación	Setting time (min)	pH de solución al 1%	Perdida en el secado	Contenido de cenizas
Pectina comercial (R.S)	67-75%	3-3.3	2.9-3.5	12%	10%
Pectina de mazorca	93.68%	3.5	3.4	14%	7%
Pectina de cascarilla	75%	5	2.8	16%	11%

Tabla 8. Comparación organoléptica

PROPIEDADES	Textura	Color	Sabor	Olores
Pectina comercial (R.S)	Polvo de libre fluidez	Crema	Ninguno	Ninguno
Pectina de mazorca	Polvo de libre fluidez	Crema	Ninguno	Ninguno
Pectina de cascarilla	Polvo de libre fluidez	Café	Ninguno	Ninguno

En los espectros infrarrojos obtenidos para la pectina de la mazorca del cacao y la cascarilla de la almendra del cacao, se observa una gran semejanza con el espectro de la pectina comercial “rapid set”. Las pectinas obtenidas en este trabajo muestran los picos característicos de una pectina comercial. A continuación se comparan los grupos más representativos de los picos que corresponden a los

grupos ácido y éster de la pectina, similar a los obtenidos por Sierra y Bolaños en su investigación.

A continuación se realiza una ligera descripción de grupos funcionales característicos de la pectina.

- **Características del ácido:** El hidroxilo absorbe en una longitud de onda aproximada de 3400 cm^{-1} y se observa el grupo carboxílico a una longitud de onda de 1637 cm^{-1} . Este pico se debe a que la pectina como se menciona anteriormente es un polímero constituido principalmente por ácido galacturónico.
- **Características del grupo éster:** Los picos referentes al grupo éster del polímero, corresponden los que absorben entre 1700 y 1750 cm^{-1} , lo cual corrobora el grado de esterificación de la pectina de la mazorca del cacao. La pectina de la cascarilla no presenta el grupo éster bien definido en el espectro infrarrojo, esto probablemente el que la almendra pasa por un proceso fermentativo y luego una tostión, y se puede pensar que este proceso puede afectar la integridad de la protopectina presente y esto se ve reflejado en su espectro.

El pH de solución de pectina al 1% se asemeja al valor reportado para una pectina ultra rapid set y el de la cascarilla se asemeja a una pectina ultra rapid set.

5. ANÁLISIS ECONÓMICO A ESCALA DE LABORATORIO

Todos los cálculos fueron realizados con base en los costos de extraer un kilogramo de pectina (1Kg), utilizando los balances de materia que aparecen en el diagrama de bloques (ver anexo1) y los costos energéticos se realizaron con base en los tiempos del ensayo del punto medio (según el diseño de experimentos empleado). Los costos de los servicios industriales (agua y energía eléctricas) fueron tomados del valor cobrado por las Empresas Publicas de Medellín a una compañía local ubicada en el municipio de Envigado.

5.1 COSTOS DE MATERIA PRIMA.

Tabla 9. Costos de Materia Prima

Materia Prima		Mazorca		Cascarilla	
Descripcion	Precio (\$/Kg)	Consumo (Kg/Kg _{pectina})	Costo (\$/Kg _{pectina})	Consumo (Kg/Kg _{pectina})	Costo (\$/Kg _{pectina})
Mazorca	5.00	45.59	227.95		
Cascarilla	2.50			13.95	34.88
Etanol comercial	2,000.00	580.00	1,160,000.00	580.00	1,160,000.00
Acido muriatico	948.00	10.00	9,480.00	10.00	9,480.00
Agua (EPM)	1.63	800.00	1,305.02	800.00	1,305.02
Costo bruto MP			\$ 1,171,013		\$ 1,170,819.90

El precio de venta de una pectina “ultra rapid set” es de \$80,000 por kilogramo sin incluir el impuesto al valor agregado IVA. Como se observa en la tabla 8 los costos de la materia prima son mayores que el costo del producto. Teniendo en cuenta el que el margen bruto es la diferencia entre precio de venta y el costo de las materias primas, se obtendría un saldo de -\$ 1,091,013 y -1,090,820 para la pectina obtenida a partir de la mazorca del cacao y la de la cascarilla de la almendra del cacao respectivamente.

El insumo que representa un mayor costo es el etanol, que a nivel industrial se puede recuperar en su gran mayoría con la pureza requerida para la precipitación de la pectina después de la hidrólisis.

5.2 COSTOS DE SERVICIOS INDUSTRIALES

Tabla 10. Costos de servicios industriales

Servicios industriales		Mazorca			Cascarilla		
Descripcion	Precio (\$/KWh)	Consumo (KWh)	Tiempo (h/Kg _{pectina})	Costo (\$/Kg _{pectina})	Consumo (KWh/Kg _{pectina})	Tiempo (h/Kg _{pectina})	Costo (\$/Kg _{pectina})
Estufa	275.98	1.27	1.00	275.98	1.04	1.00	287.48
Licuada		0.60	0.25	69.00	0.80	0.25	220.78
Centrifuga		0.40	4.00	1,103.92	0.18	4.00	48.30
Horno		1.27	24.00	6,623.52	60.00	24.00	16,558.80
Costo bruto energia				\$ 8,072.42			\$ 17,115.36

En la tabla anterior se presentan las necesidades energéticas básicas para cada uno de los equipos que se requieren para realizar el proceso de extracción de pectina y su respectivo costo.

5.3 COSTO DE MANO DE OBRA.

Los siguientes cálculos se hacen con base en las siguientes suposiciones:

- El tiempo empleado desde el licuado hasta terminar el proceso de purificación es de 7 horas teniendo en cuenta los tiempos ociosos y las necesidades básicas de un ser humano.
- El tiempo en obtener 1.58 g de pectina (resultados experimentales) es el mismo que se requiere para obtener un kilogramo (1Kg) de pectina.
- No se tiene en cuenta el tiempo empleado en el proceso de secado de la pectina.

Teniendo en cuenta estas suposiciones se presenta el costo de mano de obra para un proceso de extracción de pectina a escala de laboratorio.

Tabla 11. Costos de mano de obra

Descripcion	Precio (\$/h)	Tiempo (h/Kg _{pectina})	Costo (\$/Kg _{pectina})
SMLVH	2,067	7	21,942
Factor prestacional	51.65%		

5.4 ALQUILER DE EQUIPOS

A continuación, se presenta los costos de alquiler de los equipos necesarios para la extracción y purificación de la pectina a partir de los subproductos del beneficio del cacao.

Tabla 12. Costos de alquiler de equipos.

Descripcion	Precio (\$/h)	Tiempo (h/Kg _{pectina})	Costo (\$/Kg _{pectina})
P calentamiento	600	1.00	600
Licuada	200	0.25	50
Centrifuga	3000	4.00	12000
Horno	2500	24.00	60000
Costo bruto Alquiler			72,650.00

Con base en lo cálculos realizados se puede observar que a escala de laboratorio no es factible económicamente la producción de pectina. Esto es de esperarse ya que los requerimientos para la producción de pectina son altos y necesitan de una infraestructura diferente a la utilizada a escala de laboratorio.

6. CONCLUSIONES

- Los factores estudiados tiempo de cocción, tiempo de hidrólisis y pH ni sus respectivas interacciones, no presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta “Rendimiento” en los niveles estudiados.
- El tiempo de cocción y el tiempo de hidrólisis mostraron efectos significativos de carácter positivo y negativo respectivamente, sobre en la variable de respuesta “Grado de metoxilo” en los niveles estudiados.
- Ninguna de las interacciones entre los factores estudiados mostró efectos significativos sobre las variables de respuesta estudiadas en el proyecto.
- La pectina obtenida a partir de la mazorca del cacao con las condiciones del punto medio se puede catalogar como una pectina “ultra rapid set” y la obtenida a partir de la cascarilla se puede clasificar como una pectina “rapid set”.
- A escala de laboratorio el proceso de extracción no es viable económicamente, como se ha establecido en trabajos anteriores (Bolaños, Sierra, 2007 y Alvarez, 2008).
- Los mejores resultados (95.45% de G.M y 5.39% de rendimiento) se obtuvieron con Tc: 25 min, Th: 30 min y pH: 2.
- De acuerdo al modelo estadístico desarrollado y a los valores de las variables propuestas se concluye teóricamente que las mejores condiciones se encuentran en el punto medio. Esta conclusión teórica se corroboró con el desarrollo experimental, lo que indica una gran correlación entre la teoría y la práctica.

7. RECOMENDACIONES

- Para un proyecto de escalamiento del proceso de extracción de pectina a partir de subproductos del beneficio del cacao se debe de optimizar el uso del etanol como sustancia para precipitar ya que este es el insumo mas costoso y el que se requiere en mayor cantidad en este proceso.
- Realizar ensayos sobre la cáscara de mazorca deshidratada con un contenido máximo de humedad del 6.4%, al valor al cual se ha llegado en ensayos a escala de laboratorio y compararlos con los resultados obtenidos en esta investigación sobre cáscara no deshidratada.
- Hacer ensayos sobre cáscara verde donde teóricamente debe haber mayor contenido de pectina. Esta recomendación es válida para aprovechar toda la mazorca verde que por error resulta al cosechar el fruto del cacao.
- Extraer pectina de cascarilla de almendra sin tostar y comparar los resultados.
- Determinar las mejores condiciones para extraer pectina de una mezcla de cáscara y cascarilla. Aunque ensayos preliminares mostraron resultados positivos, no se han definido las condiciones exactas para una buena extracción.
- Estudiar el efecto de otros agentes hidrolizantes como ácido nítrico y ácido cítrico los cuales se mencionan ampliamente en la literatura. Igualmente estudiar el efecto de otros agentes precipitantes de la pectina como el hexametáfosfato de sodio y algunas sales de Ca y Mg, las cuales podrían reducir los costos de utilizar etanol comercial.
- Se recomienda el uso de una columna de destilación que permita recuperar el etanol con una pureza superior al 90%. Por experiencia en este trabajo y

en trabajos anteriores sobre pectinas se sabe que el etanol recuperado en el laboratorio mediante una destilación simple, no sirve para precipitar pectinas eficientemente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adomako D. 1972. Cocoa pod husk pectin. En: phytochemistry, Vol. 11 pp. 1145-1148.
2. Barrett A., Northcote D. 1965, Apple fruit pectic Substances. En: Biochemical journal, Vol. 94 pp. 617-627.
3. Cabeza M. 2004, Microorganismos productores de pectinazas a bajas temperaturas para vinificación, CONICET Y Laboratorio de biotecnología, Departamento de Biología - Alimentación de la facultad de ciencias de la Universidad de San Martín, Argentina.
4. Devia J., Proceso para producir pectinas cítricas. 2003. En: Revista universidad EAFIT, Numero. 129 pp. 21-30.
5. D`addonisio R., Marín M., Ruesga L., Vasquez R. 2008. Extracción de pectina a partir de la cascara del plátano (Mussa AAB, subgrupo plátano) clon harton. Revista facultad agronómica, Vol. 25 pp. 318-333.
6. FEDECACAO, 2004. FONDO NACIONAL DEL CACAO. El beneficio y características físico químicas del cacao.
7. GAITÁN N. 2005. Cadena del Cultivo del Cacao Con Potencial Exportador. Managua.
8. GAVIRIA, N., LOPEZ, L. 2005. Extracción a escala laboratorio de la pectina del maracuyá y escalado preliminar a planta piloto. Universidad Eafit. Medellín.

9. Kurita O., Fujiwara T., Yamazaki E. 2008. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. En: Carbohydrate polymers. Vol. 74 pp. 725-730.
10. Masmoudi M., Besbes S., Chaabouni M., Robert C., Paquot M., Blecker C., Attia H. 2008. Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology. En: Carbohydrate polymers. Vol. 74 pp. 185-192
11. Mc Cready, R.M. 1970. Pectin. In M.A Joslyn (ed.). Methods in food analysis. 2 nd ed. Pp 565.699. Ney York and London Academy Press.
12. Pagan J. 1998. Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo del melocotón, Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes,
13. Pescador, C., Ramirez, M. C. 2003. Estudio de factibilidad para el montaje de una planta procesadora de pectina y miel a base de subproductos de cafe en la zona centro sur del departamento de Caldas. Universidad de Caldas. Manizales.
14. Pinheiro E., Silva I., Gonzaga L., Amante E., Teófilo R., Ferreira M., Amboni R. 2008. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. En: Bioresource Technolgy Vol. 99 pp. 5561-5566
15. Gutiérrez-Pulido, H. y De la Vara-Salazar, R. 2003. Análisis y Diseño de Experimentos. Editorial McGraw Hill, México.
16. Rattonji D., Norman A. 1928. The estimation of the individual pectic substances in nature. Departamento de bioquímica, Universidad de Birmingham, Inglaterra.

17. Rees D., Wight J. 1969. Methylacion análisis of pectic polysaccharides from the cptyledons of the White mustard. En: Biochemical jornal. Vol. 115 pp. 431-439.
18. Rodrigues N. 2001. Manejo Integral del Cultivo del Cacao, Facultad de Agronomía U.C.V., Venezuela.
19. Sánchez R. 2003. Notas de Coyuntura Cacaotera, Dirección de Cadena Productivas, Colombia, 2003.
20. Scabio A., Fertoni H., Schemin M., Petkowicz C., Carneiro E., Nogueira A., Wosiacki G. 2007. A Model For Pectin Extaction From Apple Pomance. En: Brazilian Jourenal of food technology, 2007. Vol. 10 pp. 259-265.
21. Schultz T.H. 1965. Determination of the degree of esterification of pectin, determination of the esther methoxyl content of pectin by saponification and titration. Methods in carbohydrate Chemistry.5.189. Academic Press, New York.
22. Sierra L., Bolaños S. 2006. Diseño de un proceso para la obtención y purificación de pectina de los desechos del beneficio del café, Universidad EAFIT, Colombia.
23. Torre F. 2005. Apuntes de espectrometría. Fonaments químics. Universidad de Girona. España. Pag. 1-20
24. TURTON, R. and Bailie, R. C. "Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes". Second Edition. Prentice Hall. 2003. ISBN: 0130647926
25. Wang S., Chen F., Wu J., Wang Z., Liao X., Hu X. 2005. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from Apple pomace using response surface methodology. En: Journal of food engineering. Vol. 78 pp. 693-700.

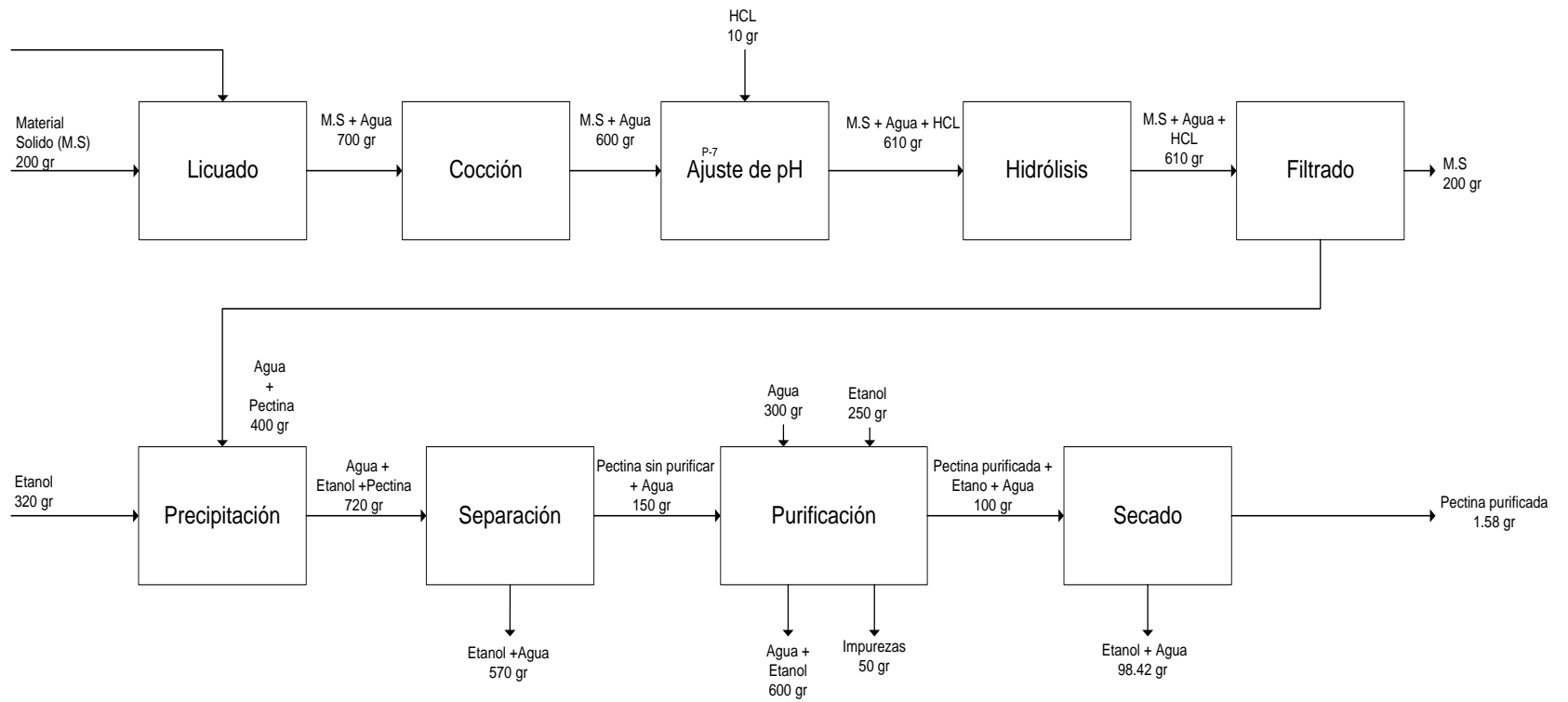
26. Yegres S., Sánchez J., Belmar M., Riberos W. y Belmar D. 2001. Producción de enzimas pécicas ensayos preliminares, En: Saber Vol. 13 pp. 55-59.

CIBERGRAFÍA

1. EL CULTIVO DEL CACAO. [Citado 22 de Julio de 2008]. Disponible en Internet en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/cacao2.htm>.
2. PRODUCTOS SEMIELABORADOS. [Citado 25 de Julio de 2008]. Disponible en Internet en: <http://www.ecuacocoa.com/espanol/index.php>
3. CACAO [Citado 30 de Julio de 2008]. Disponible en Internet en: http://www.agrocadenas.gov.co/cacao/c_cacao.htm.
4. Calvo 2007 [Citado 22 de Septiembre 2008]. Disponible en internet: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/pectinas.html>

ANEXOS

ANEXO I. Diagrama de bloques del proceso



ANEXO II. Tabla de efectos y coeficientes estimados para grado de metoxilación.

Tabla de efectos y coeficientes estimados para grado de metoxilación					
Terminos	Efectos	Coeficientes	SE Coef	T-student	P-valor
Constantes		78	0.6048	128.97	0
Tc	4.052	2.026	0.6048	3.35	0.009
Th	-4.055	-2.027	0.6048	-3.35	0.008
pH	1.453	0.726	0.6048	1.2	0.26
Tc*Th	2.113	1.056	0.6048	1.75	0.115
Tc*pH	-0.49	-0.245	0.6048	-0.41	0.695
Th*pH	-2.137	-1.069	0.6048	-1.77	0.111

ANEXO III. Tabla de efectos y coeficientes estimados para Rendimiento.

Tabla de efectos y coeficientes estimados para Rendimiento					
Terminos	Efectos	Coeficientes	SE Coef	T-student	P-valor
Constant		2.59896	0.2421	10.74	0
Tc	-0.16319	-0.0816	0.2421	-0.34	0.744
Th	0.26042	0.13021	0.2421	0.54	0.604
pH	-0.13542	-0.06771	0.2421	-0.28	0.786
Tc*Th	0.01042	0.00521	0.2421	0.02	0.983
Tc*pH	0.75347	0.37674	0.2421	1.56	0.154
Th*pH	-0.05903	-0.02951	0.2421	-0.12	0.906
Tc*Th*pH	-0.19792	-0.09896	0.2421	-0.41	0.692
Ct Pt		1.78993	0.7262	2.46	0.036